

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



COMPARAÇÃO ENTRE AS VACINAS LETIFEND® E CANILEISH® RELATIVAMENTE
AOS SEUS EFEITOS SECUNDÁRIOS EM CÃES DOMÉSTICOS: UM ESTUDO
RETROSPETIVO

BRIGITE NETO DA FONSECA

ORIENTADORA:

Dra. Cátia Barneto

COORDINADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



COMPARAÇÃO ENTRE AS VACINAS LETIFEND® E CANILEISH® RELATIVAMENTE
AOS SEUS EFEITOS SECUNDÁRIOS EM CÃES DOMÉSTICOS: UM ESTUDO
RETROSPETIVO

BRIGITE NETO DA FONSECA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI:

PRESIDENTE:

Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

ORIENTADORA:

Dra. Cátia Barneto

COORIENTADOR:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

2020

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Brigitte Neto da Fonseca

Título da Tese ou Dissertação:

Comparação entre as vacinas Letifend® e CaniLeish® relativamente aos seus efeitos secundários em cães domésticos: Um estudo retrospectivo

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☒ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 12 de Março de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: _____

Brigitte Fonseca

Agradecimentos

Quero agradecer à minha orientadora, a Dra. Cátia Barneto por todo o apoio que me deu durante a realização deste trabalho, pois sem a sua ajuda e conhecimentos teria sido impossível a concretização do mesmo. Do mesmo modo agradeço ao meu coorientador, o Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, pela sua supervisão, disponibilidade e conselhos.

Expresso a minha gratidão a todos os médicos/as, enfermeiros/as e auxiliares do Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULisboa, assim como do Hospital Veterinário do Restelo, onde realizei o estágio por todos os ensinamentos que me deram, quer profissionais quer de experiência de vida.

Quero também agradecer e felicitar simultaneamente as minhas amigas, que me acompanharam neste percurso desde o início. Foi incrível fazer esta caminhada convosco e espero que continuemos juntas em mais aventuras no futuro.

Acima de tudo quero agradecer aos meus pais, por me terem dado a possibilidade de realizar este curso e aprender uma profissão que certamente me abrirá muitas portas no futuro. Sem os seus sacrifícios nada disto teria sido possível. Do mesmo modo agradeço à minha restante família pelo seu apoio incondicional.

A todos, muito obrigada!

Resumo

COMPARAÇÃO ENTRE AS VACINAS LETIFEND® E CANILEISH® RELATIVAMENTE AOS SEUS EFEITOS SECUNDÁRIOS EM CÃES DOMÉSTICOS: UM ESTUDO RETROSPETIVO

A leishmaniose canina é provocada pelo parasita *Leishmania infantum*, sendo que, a doença tem efeitos generalizados no organismo, uma vez que afeta células do sistema fagocitário mononuclear, como os macrófagos. Atualmente, um dos métodos de controlo e prevenção desta doença envolve o uso de vacinas nos cães.

O objetivo principal deste estudo retrospectivo foi avaliar a incidência e o tipo de efeitos secundários desenvolvidos pelos cães após o uso de duas vacinas, a CaniLeish® e a Letifend® e posteriormente comparar as duas vacinas em termos da sua segurança.

Foram colhidos dados de 157 cães (73 inoculados com CaniLeish® e 84 com Letifend®). Dos animais vacinados com CaniLeish®, 15 desenvolveram efeitos adversos, sendo que, a incidência destes efeitos não aparentou estar relacionado com a idade ou com o sexo do animal. Contudo, parece ter havido uma relação com o peso dos cães, uma vez que, 12 dos animais afetados tinham um peso inferior a 15 Kg. Consequentemente, as raças de cães que apresentavam estes efeitos eram na maioria de pequeno porte, como o Yorkshire Terrier. Pelo contrário os animais vacinados com Letifend® não desenvolveram qualquer efeito adverso, pelo que, com base na amostra estudada, concluiu-se que esta é uma vacina mais segura comparativamente com a CaniLeish® no que respeita ao aparecimento de reações secundárias.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*, leishmaniose canina, vacinas, CaniLeish®, Letifend®, efeitos secundários.

Abstract

COMPARISON BETWEEN THE VACCINES CANILEISH® AND LETIFEND® IN RELATION TO THEIR SECONDARY EFFECTS IN DOMESTIC DOGS: A RETROSPECTIVE STUDY

Canine leishmaniasis is caused by the parasite *Leishmania infantum*, and the disease has widespread effects on the body, as it affects cells of the mononuclear phagocytic system, such as macrophages. Currently, one of the methods of control and prevention of this disease involves the use of vaccines in dogs.

The main objective of this retrospective study was to assess the incidence and type of secondary effects developed in dogs after the use of two vaccines, CaniLeish® and Letifend®, and then compare the two vaccines in terms of their safety.

Data was collected from 157 dogs (73 inoculated with CaniLeish® and 84 with Letifend®). Of the animals vaccinated with CaniLeish®, 15 developed adverse effects but the incidence of these effects did not appear to be related to the age or sex of the animal. However, there seems to have been a relationship with the weight of the dogs since 12 of the affected animals weighed less than 15 kg. Consequently, the breeds of dogs that had these effects were mostly small, such as the Yorkshire Terrier. On the contrary, the animals vaccinated with Letifend® did not develop any adverse effects, based on the studied sample, so it was concluded that this is a safer vaccine compared to CaniLeish® in what concerns secondary reactions.

Keywords: *Leishmania infantum*, canine leishmaniasis, vaccines, CaniLeish®, Letifend®, secondary effects.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Índice de Gráficos	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Capítulo 1 – Relatório de Atividades de Estágio	1
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	3
1) Leishmaniose Canina	3
1.1) Generalidades e Distribuição	3
1.2) Importância em saúde pública	5
1.3) Epidemiologia	7
1.3.1) Fatores epidemiológicos relacionados com o hospedeiro invertebrado	7
1.3.2) Fatores epidemiológicos relacionados com o hospedeiro vertebrado	9
1.3.3) Papel epidemiológico desempenhado por outras espécies	9
1.4) Morfologia.....	10
1.5) Transmissão e Ciclo de vida	
definido.....	11
1.6) Patogénese e Resposta imunitária.....	13
1.6.1) Outros fatores.....	15
1.7) Sinais clínicos	15
1.8) Alterações laboratoriais.....	18
1.9) Diagnóstico.....	19
1.9.1) Técnicas parasitológicas.....	19
1.9.2) Técnicas serológicas.....	20
1.9.3) Técnicas moleculares	22
1.10) Tratamento	23
1.11) Monitorização	25
1.12) Prognóstico	25
1.13) Controlo e Prevenção	26
1.13.1) Inseticidas tópicos.....	26
1.13.2) Inseticidas ambientais e outras medidas de prevenção.....	27

1.13.3) Eutanasia	28
1.13.4) Novos métodos de controlo	28
1.14) Vacinação	29
1.14.1) Mecanismo imunológico	30
1.14.2) Adjuvantes	30
1.14.3) Vacinas	31
1.14.3.1) Leishmune®	31
1.14.3.2) Leish-Tec®	32
1.14.3.3) CaniLeish®	33
1.14.3.4) Letifend®	35
1.14.4) Aplicação em estratégias de controlo	37
1.14.5) Perspetivas futuras	37
Capítulo 3 - Estudo retrospectivo sobre os efeitos secundários das vacinas Letifend® e CaniLeish®	39
1) Objetivos do estudo	39
2) Material e Métodos	40
2.1) Amostragem	40
2.1.1) Critérios de exclusão	40
2.2) Análise estatística	40
3) Resultados	41
3.1) Caracterização da amostra	41
3.1.1) CaniLeish®	41
3.1.2) Letifend®	48
3.2) Comparação entre os efeitos secundários causados pelas vacinas CaniLeish® e Letifend®	49
4) Discussão	50
Capítulo 4 – Conclusão	56
Capítulo 5 – Bibliografia	58

Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição atual conhecida de <i>Phlebotomus perniciosus</i> : Janeiro 2018.....	4
Figura 2: Flebótomo fêmea (<i>Phlebotomus</i> spp.), vetor de <i>Leishmania infantum</i> no Velho Mundo.....	8
Figura 3: Amastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	10
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i>	12
Figura 5: Sinais clínicos da leishmaniose canina.....	17

Índice de Tabelas

Tabela 1: Caracterização dos animais que tiveram efeitos adversos, incluindo o protocolo vacinal, descrição dos efeitos secundários e tratamento aplicado.....	43
Tabela 2: Distribuição dos animais por inoculação em que surgiram os efeitos secundários.....	47
Tabela 3: Evolução do protocolo vacinal dos animais que tiveram efeitos adversos à vacina CaniLeish®.....	47

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Número de horas despendidas em cada rotação.....	1
Gráfico 2: Distribuição por idades dos cães vacinados com CaniLeish®.....	41
Gráfico 3: Distribuição por pesos dos cães vacinados com CaniLeish®.....	41
Gráfico 4: Distribuição da incidência de efeitos secundários.....	42
Gráfico 5: Distribuição dos efeitos secundários por raça.....	45
Gráfico 6: Distribuição dos efeitos secundários por sexo.....	45
Gráfico 7: Distribuição dos efeitos secundários por idade.....	45
Gráfico 8: Distribuição dos efeitos secundários por peso.....	46
Gráfico 9: Distribuição da incidência do tipo de efeito secundário.....	46
Gráfico 10: Distribuição por idades dos cães vacinados com Letifend®.....	48
Gráfico 11: Distribuição por pesos dos cães vacinados com Letifend®.....	48
Gráfico 12: Incidência de efeitos adversos provocados pelas vacinas CaniLeish® e Letifend® em comparação com o número total de animais de cada grupo.....	50

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BID – A cada 12 horas (duas vezes ao dia)

CanL – Leishmaniose canina

CL – “Cutaneous Leishmaniasis” – Leishmaniose Cutânea

CLWG – “Canine Leishmaniasis Working Group” – Grupo de trabalho da Leishmaniose canina

DNA – “Deoxyribonucleic acid” – Ácido Desoxirribonucleico

DV – Descontinuou a vacina

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ESP – “Excretory-secretory products” – Produtos de excreção-secreção

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

FML – “Fucose-Mannose Ligand” – Ligando Fucose-Manose

HEFMV-UTL – Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade de Lisboa

ICT – “Immunochromatographic Test” – Teste Imunocromatográfico

IFAT – “Immunofluorescence Antibody Test” – Teste de Imunofluorescência de Anticorpos

IRIS – “International Renal Interest Society” – Sociedade Internacional de Interesse Renal

IV– Via endovenosa

kDNA – DNA do cinetoplasto

Kg – quilograma

L – Trocou para a Letifend®

mg – miligrama

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

mm – milímetro

MV – Médicos Veterinários

M - Morreu

NFTR – Não fez o teste rápido

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PCR – “Polymerase Chain Reaction” – Reação em Cadeia da Polimerase

PO – Per os (via oral)

RA – Reforço anual

RNA – “Ribonucleic acid” – Ácido Ribonucleico

SC – Via subcutânea

SID – A cada 24 horas (uma vez por dia)

TID – A cada 8 horas (três vezes ao dia)

TR – Teste rápido

VA – Vacina atual

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VL – “Visceral Leishmaniasis” – Leishmaniose Visceral Humana

WHO – “World Health Organization” – Organização Mundial de Saúde

X – Média

μm – micrómetro

% – Percentagem

σ – Desvio Padrão

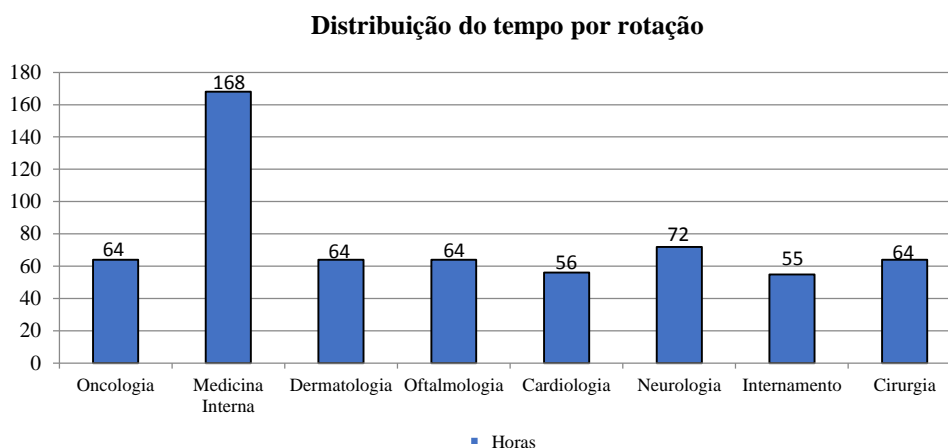
Capítulo 1 – Relatório de Atividades de Estágio

O estágio curricular decorreu no Hospital Veterinário do Restelo e foi supervisionado pelos médicos veterinários Drs. Cátia Barneto e André Santos. Teve a duração total de quatro meses e meio, tendo começado no dia 5 de março e finalizado no dia 12 de Julho de 2018.

O estágio funcionou mediante rotações entre diversas especialidades, cada uma com a duração de duas semanas. Em cada rotação, era necessário escolher um médico veterinário e posteriormente acompanhar as suas tarefas, sendo que o horário realizado pela estagiária era semelhante ao do médico, geralmente 8 horas diárias, com exceção dos turnos noturnos, que eram de 12 horas. Graças a este modelo foi possível contactar com diversas especialidades, nomeadamente oncologia, medicina interna, dermatologia, oftalmologia, cardiologia, neurologia e cirurgia. Adicionalmente a autora também realizou uma rotação no internamento. Este sistema permitiu um contacto mais aprofundado com as técnicas de diagnóstico, métodos de tratamento e prognóstico de diversas doenças exclusivas de cada especialidade. Simultaneamente tornou-se uma ferramenta de aprendizagem valiosa para compreender o funcionamento integrado de um hospital veterinário no modo como aborda os seus pacientes, visto que na maioria das situações os animais tinham afeções que abrangiam mais do que uma especialidade e como tal era necessário um esforço conjunto entre vários médicos veterinários.

O Hospital Veterinário do Restelo funciona 24 horas por dia, dispõe de serviço de urgência e para além das especialidades já mencionadas, também providencia serviços de Imagiologia (ecografia, ecocardiografia, radiografia e tomografia computadorizada) e possui unidades de isolamento para carnívoros domésticos e para animais exóticos. O tempo empregue pela autora em cada especialidade está representado no gráfico que se segue:

Gráfico 1: Número de horas despendidas em cada rotação.



Durante o estágio a autora recebeu os pacientes e os seus tutores, assistiu às consultas, ajudou os médicos veterinários na contenção dos animais e auxiliou na realização de vários exames complementares, como exames de diagnóstico por imagem. Também participou na colheita e processamento de amostras de sangue para análise, especificamente análises de hemograma, bioquímicas, ionograma e na determinação dos valores do microhematócrito e de glicémia. Para além disso, colocou cateteres, administrou vacinas, fez medição da pressão arterial sanguínea e preparou os fármacos prescritos para administração aos pacientes.

No final das consultas cada caso clínico era discutido com o médico veterinário relativamente aos vários diagnósticos diferenciais, exames complementares a realizar, assim como tratamentos e prognósticos possíveis.

Exclusivamente durante o internamento foi efetuada a administração da medicação prescrita aos pacientes por via oral, intramuscular, subcutânea e endovenosa e dado apoio nutricional e cuidados paliativos.

Na rotação de cirurgia, a função principal era auxiliar o médico veterinário como ajudante de cirurgião, essencialmente através da tração da pele ou órgãos e no apoio em funções de limpeza do campo cirúrgico, durante e após a cirurgia. A autora também era responsável pela monitorização dos animais pós cirurgia.

Relativamente à casuística observada durante o estágio, constatou-se que os estímulos iatrotrópicos mais frequentemente mencionados pelos tutores como motivo para a consulta de medicina geral foram: anorexia, vômito, diarreia e prostração. As consultas de vacinação, desparasitação e/ou reavaliação eram também extremamente comuns, assim como casos de disúria em felinos, maioritariamente devido a cálculos urinários e urgências devido a trauma.

Em oncologia, os tumores mais frequentes foram o linfoma intestinal nos felinos e o adenocarcinoma mamário em gatas e cadelas.

Em dermatologia, a dermatite atópica foi a doença de pele mais comum.

Em oftalmologia as consultas mais habituais deviam-se à presença de úlceras oculares por trauma.

Em cardiologia as situações mais comuns foram a endocardiose da válvula mitral e a cardiomiopatia hipertrófica em gatos.

As cirurgias mais frequentes incluíram a resolução de fraturas, hemilaminectomias e laparotomias para: colocação de bypass, esterilizações e remoção de tumores e corpos estranhos.

1) Leishmaniose Canina

1.1) Generalidades e Distribuição

A leishmaniose engloba um grupo de doenças parasitárias, provocadas por protozoários parasitas do género *Leishmania*, que invadem e proliferam nas células do sistema mononuclear fagocitário de diversas espécies de mamíferos (Beugnet & Chomel, 2013; World Health Organization [WHO], 2017).

Globalmente, cerca de 70 espécies de mamíferos, incluindo o ser humano, são tidas como hospedeiros de diversas espécies de *Leishmania*, embora a infeção seja mais comum em canídeos e roedores (Ribeiro et al., 2018).

A espécie *Leishmania infantum* foi identificada como a mais virulenta em cães (Beugnet & Chomel, 2013) sendo o principal agente etiológico da leishmaniose canina (CanL) (Ribeiro et al., 2018). A transmissão do parasita ocorre devido à picada de insetos flebotómíneos dos géneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, existentes no Novo e Velho Mundo, respetivamente (WHO, 2017; Dalvi, Carvalho & Werneck, 2018).

A doença é endémica em mais de 70 países e está distribuída pela bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente, Ásia Central, África Subsariana Ocidental e na América Central e do Sul (Beugnet & Chomel, 2013; Beugnet, Halos & Guillot, 2018). Na Europa a CanL é uma doença endémica em Portugal, Espanha, Sul de França (incluindo a ilha de Córsega), Grécia, Itália (incluindo as ilhas da Sicília e Sardenha), Chipre, Croácia, Albânia e Malta (Maia & Cardoso, 2015). Na última década, a seroprevalência da infeção aumentou consideravelmente em zonas do Sul da Europa (Maia & Cardoso, 2015), onde análises serológicas estimam que 2,5 milhões de cães estão infetados com *Leishmania infantum* (Moreno & Alvar, 2002; Willen & Petr Volf, 2018). Esta estimativa é difícil de apurar, pois é avaliado que a prevalência da infeção numa zona endémica ronde os 60-80% da população (Solano-Gallego et al., 2011; Kaszak, Planellas & Dworecka-Kaszak, 2015; Baxarias et al., 2018), contudo o número de cães que realmente apresentam sinais clínicos é muito inferior, somente 5-10% dos animais (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau, & Ferrer, 2008; Miró & López-Vélez, 2018).

Para além do aumento do número de casos de leishmaniose canina em áreas endémicas, recentemente têm surgido casos autóctones de CanL em áreas da Europa que anteriormente não eram afetadas pela doença, nomeadamente em áreas mais frias e/ou setentrionais (Maia &

Cardoso, 2015; Gálvez, Montoya, Fontal, Murguía & Miró, 2018; Rutte, Straten & Overgaauw, 2018), mais concretamente, no Norte de França, no Norte de Espanha (Pirenéus, Catalunha e Galiza), nos Alpes e em países como a Bélgica, Áustria, Holanda, Reino Unido, Alemanha, Dinamarca e Hungria (Solano-Gallego et al., 2011; Maia & Cardoso, 2015; Beugnet et al., 2018; Schäfer et al., 2019) (Fig. 1).

A distribuição de *Leishmania infantum* reflete a verificada pelos flebótomos (Beugnet et al., 2018), pelo que o aumento da mesma pode dever-se à expansão geográfica do inseto, possivelmente devido ao aquecimento global (Trájer et al., 2013; Gálvez et al., 2018), que permite que as zonas com latitudes e altitudes máximas que garantem a sobrevivência e reprodução deste inseto vetor estejam a aumentar (Maia & Cardoso, 2015).

Adicionalmente, as condições socioeconómicas da população são um fator relevante, pois a sua melhoria permitiu um acréscimo no transporte de cães entre países Europeus, particularmente: cães infetados provenientes de países endémicos e que são depois adotados em países livres da doença e cães que viajam com os tutores para países endémicos, onde são infetados antes de regressarem aos países de origem (Maia & Cardoso, 2015; Otranto et al., 2017; Gálvez et al., 2018). Em ambas as situações estes cães constituem um importante reservatório do parasita, uma vez que, se nos locais onde residem existirem condições favoráveis à transmissão de *Leishmania* sp., como densidades elevadas de flebótomos e de outros cães, a infeção pode espalhar-se rápida e extensivamente entre a população canina residente, podendo inclusive formar um novo foco endémico (Maia & Cardoso, 2015; Otranto et al., 2017).

Para além da leishmaniose canina ser uma doença com uma distribuição geográfica muito vasta, é uma doença relevante em medicina veterinária devido à gravidade que adquirem os seus quadros clínicos. O diagnóstico e tratamento da doença é desafiante para os médicos veterinários (MV). Há relatos de curas espontâneas e o tratamento frequentemente leva a cura clínica, contudo nos cães tratados os parasitas não são totalmente eliminados e como tal as recaídas são comuns. Quase sempre a doença progride gradualmente até a morte do animal (Beugnet & Chomel, 2013; Beugnet et al., 2018; Pereira et al., 2019).

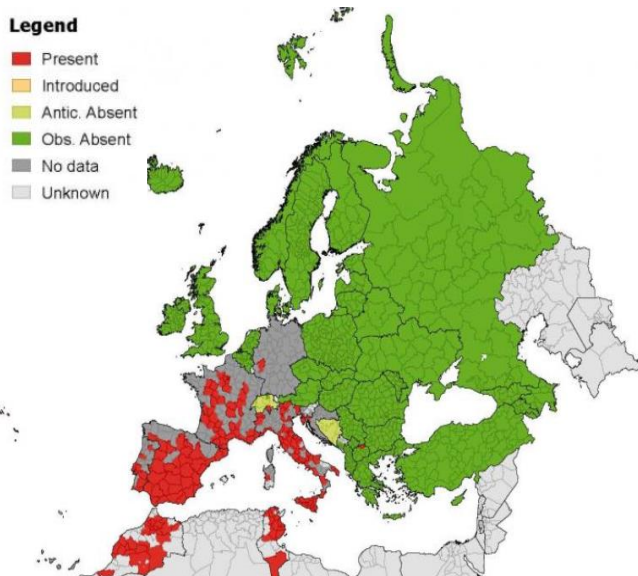


Figura 1: Distribuição atual conhecida de *Phlebotomus perniciosus*: Janeiro 2018 (disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/phlebotomus-perniciosus-current-known-distribution-january-2018>).

1.2) Importância em saúde pública

A leishmaniose humana é causada por cerca de 20 espécies de *Leishmania* e pode ser agrupada em duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (VL), com sinais generalizados como febre e pancitopénia e a leishmaniose cutânea (CL), que apesar de potencialmente poder desfigurar o hospedeiro e de causar uma morbilidade considerável, é benigna e tem tendência para uma resolução espontânea. O principal sinal são nódulos ulcerativos localizados na pele (Gramiccia & Gradoni, 2005; WHO, 2017; Sirekbasan & Polat, 2018).

Cerca de 98 países relatam a existência da doença no seu território, estando 350 milhões de pessoas em risco. Por ano ocorrem cerca de 1,3 milhões de novos casos (Alvar et al., 2012; WHO, 2017).

A suscetibilidade do ser humano à infeção é reduzida, daí que somente um pequeno número de indivíduos desenvolve sinais, em particular os que têm o sistema imunitário comprometido, como por exemplo, as crianças com idade inferior a 5 anos, pessoas subnutridas ou co-infetadas com doenças imunossupressoras como o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Gramiccia & Gradoni, 2005; WHO, 2017).

A nível global, cerca de 90% dos casos de VL ocorrem no Brasil, Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Quênia, Uganda e Etiópia. A CL tem uma distribuição mais ampla, sendo que os casos se distribuem por três regiões principais: bacia do Mediterrâneo, América Central e do Sul e desde o Médio Oriente à Ásia Central. A VL, também designada de kala-azar é fatal na maioria dos casos se não for tratada, contudo a maioria das mortes não são reconhecidas. Está estimado que a taxa de mortalidade ronda os 10-20%, cerca de 20,000 a 40,000 mortes por ano (Alvar et al., 2012; Dalvi et al., 2018).

Na região Europeia definida pela WHO, as duas formas clínicas da leishmaniose humana são endémicas e com uma distribuição geográfica ampla. A incidência anual das formas VL e CL ronda respetivamente os 1100-1900 e 10000-17000 casos (WHO, 2017; Willen & Petr Volf, 2018).

Com exceção da Índia, Nepal, Bangladesh e de países na África Oriental a leishmaniose humana é uma zoonose, transmitindo-se entre animais e apenas secundariamente ao homem (Costa, 2011; Faria et al., 2017).

As espécies principais do parasita que provocam a doença antroponótica e zoonótica são respetivamente *Leishmania donovani* e *L. infantum*. No continente Americano a principal espécie é designada de *L. chagasi*, contudo, é geneticamente semelhante a *L. infantum* (Costa, 2011). *L. infantum* provoca leishmaniose visceral no ser humano, sendo o cão doméstico o

principal hospedeiro reservatório. Já a leishmaniose cutânea é provocada maioritariamente pelas espécies *L. tropica* e *L. major* (Dalvi et al., 2008; WHO, 2017; Sirekbasan & Polat, 2018).

Deste modo, o cão como hospedeiro reservatório principal da espécie *Leishmania infantum* para o ser humano, tem um papel crucial na transmissão do parasita e no desencadear da leishmaniose visceral no homem (Ribeiro, Silva, Fulgêncio, Michalick, & Frézard, 2013; Maia & Cardoso, 2015; Ribeiro et al., 2018; Willen & Petr Volf, 2018). Isto leva a que a leishmaniose canina seja considerada uma das doenças emergentes mais importantes a nível global (Ribeiro et al., 2018), pois trata-se de uma zoonose importante no ser humano e como tal uma doença que suscita grande preocupação em termos de saúde pública (Maia & Cardoso, 2015).

É sugerido que a infeção em cães age como um marcador de risco para a transmissão de *L. infantum* para pessoas suscetíveis (Maia & Cardoso, 2015), uma vez que, maioritariamente, a distribuição geográfica da CanL e da leishmaniose visceral humana é semelhante e os casos clínicos em seres humanos são relatados em zonas endémicas onde a prevalência de leishmaniose canina é muito alta (Vulpiani, Iannetti, Di Mattia, & Dalla Villa, 2009; Abbehussen et al., 2017), o que acontece em países da América do Sul, como o Brasil, onde o número de cães infetados é enorme (Baneth et al., 2008). Contudo nos países do Sul da Europa a leishmaniose canina é mais prevalente e amplamente distribuída que a VL e a CL humanas, apesar de estarem sobrepostas geograficamente em várias regiões (Maia & Cardoso, 2015).

Um fator de risco significativo para a prevalência da leishmaniose humana é o estatuto socioeconómico da população. Em regiões de pobreza a incidência da doença é significativamente mais elevada, pois existem mais casos de malnutrição e o acesso a cuidados de saúde está comprometido. Adicionalmente, nestes locais a densidade de cães errantes e de outras espécies de hospedeiros reservatórios, como o gato é mais elevada, pelo que o reservatório do parasita junto das populações é maior (Otranto et al., 2017).

1.3) Epidemiologia

Leishmania infantum tem um ciclo de vida que alterna entre dois hospedeiros, um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor invertebrado, o flebótomo (Dostálová & Volf, 2012), como tal, a epidemiologia da leishmaniose canina resulta de interações complexas entre o inseto vetor, o hospedeiro vertebrado, o parasita e fatores ecológicos (Gharbi et al., 2015).

1.3.1) Fatores epidemiológicos relacionados com o hospedeiro invertebrado

Os flebótomos são a única fonte direta de *Leishmania infantum* para os hospedeiros vertebrados (Beugnet et al., 2018), uma vez que são os únicos artrópodes biologicamente adaptados para a transmissão deste parasita (Solano-Gallego et al., 2011). A sua distribuição geográfica e abundância determina a distribuição da CanL e os fatores que limitam o inseto são os mesmos que vão influenciar a disseminação do parasita (Costa, 2011; Willen & Petr Volf, 2018).

Os flebótomos possuem quatro estádios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. Ambos os sexos alimentam-se de secreções ricas em açúcar produzidas pelas plantas, porém apenas as fêmeas são hematófagas, pois precisam de se alimentar de sangue para completar o desenvolvimento dos ovos (Solano-Gallego et al., 2009; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel, & Gradoni, 2013) (Fig. 2). Os adultos estão ativos maioritariamente entre o crepúsculo e o amanhecer, o que corresponde à altura em que as fêmeas se alimentam. São insetos de pequenas dimensões (1,5-4 mm de comprimento) com um corpo peludo e pernas longas, deslocam-se aos saltos e têm um voo silencioso (Maroli et al., 2013; Gharbi et al., 2015; Gálvez et al., 2018) (Fig. 2).

No Novo Mundo a espécie de flebótomo que transmite *L. infantum* é principalmente *Lutzomyia longipalpis*. No Velho Mundo, em particular na Europa, as duas espécies principais são *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Beugnet et al., 2018).

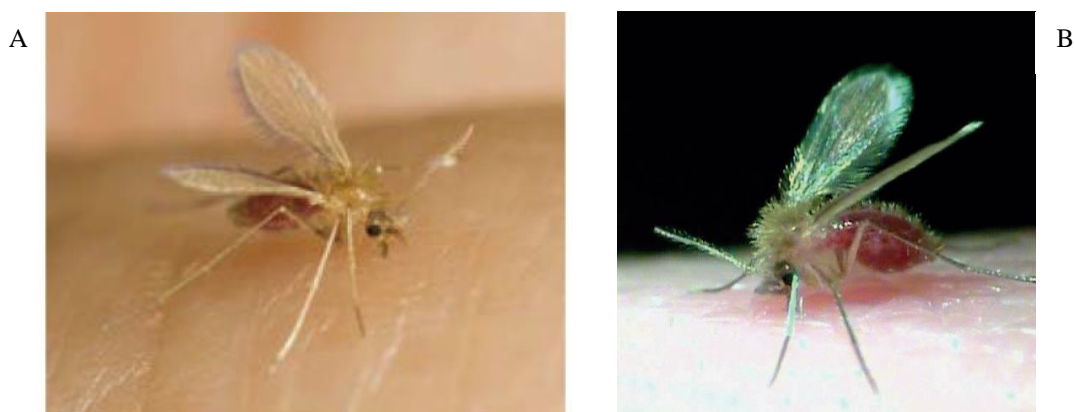
Em ambas as espécies o período de atividade do inseto tem um carácter sazonal, ocorrendo entre a primavera e o outono (Solano-Gallego et al., 2009; Beugnet et al., 2018), sendo que os meses de maior atividade são entre Abril e Novembro, o que corresponde à época de maior risco de infeção com *L. infantum* (Rutte et al., 2018). Pelo contrário os flebótomos que habitam em países tropicais e subtropicais estão ativos durante todo o ano (Solano-Gallego et al., 2009).

As condições climáticas são condicionantes importantes durante o período de atividade dos insetos (Gálvez, Descalzo, Guerrero, Miró, & Molina, 2011). O aumento da temperatura

devido ao aquecimento global pode prolongar o período de atividade reprodutiva e assim aumentar o período anual de atividade do inseto (Trajér et al., 2013) ou permitir o estabelecimento de espécies subtropicais em novas áreas. Daí que, em particular nos países com um clima temperado, os valores de temperatura média sejam cruciais para determinar a atividade do inseto. Por outro lado, a densidade de insetos e o seu nível de atividade é negativamente afetada pelo aumento da altitude, pluviosidade e vento (Gramiccia & Gradoni, 2005; Solano-Gallego et al., 2009; Gálvez et al., 2011; Trajér et al., 2013). Deste modo, as densidades do vetor variam sazonalmente devido à sua sensibilidade ao clima, o que influencia a transmissão do parasita para os hospedeiros vertebrados (Gálvez et al., 2018).

Tipicamente o alcance dos flebótomos é muito reduzido, de modo que, estão restritos a zonas próximas dos locais de desenvolvimento das larvas (Maroli et al., 2013; Gharbi et al., 2015; Gálvez et al., 2018). Os locais de repouso ideais para os adultos são húmidos e frescos (Gálvez et al., 2018), já a presença de matéria orgânica em decomposição e um ambiente húmido e quente é propício para o desenvolvimento larvar (Trajér et al., 2013; Gálvez et al., 2018). Deste modo, a existência de um equilíbrio entre ambientes silvestres e urbanos garante uma densidade superior de flebótomos (Gálvez et al., 2011), para além da presença de cães em abundância a construção de habitações com jardim providencia ao vetor inúmeros ambientes favoráveis à sua proliferação, o que pode explicar a disseminação desta doença nas cidades, onde a prevalência da CanL está a tornar-se cada vez mais comum (Beugnet et al., 2018; Velez et al., 2019).

Figura 2: A e B. Flebótomo fêmea (*Phlebotomus* spp.), vetor de *Leishmania infantum* no Velho Mundo (em Beugnet et al., 2018 & Maroli et al., 2013).



1.3.2) Fatores epidemiológicos relacionados com o hospedeiro vertebrado

O risco de desenvolver uma infecção ativa e consequentemente de apresentar sintomatologia tem uma associação incerta com o sexo ou o comprimento do pelo do cão, contudo aparenta estar relacionado com a idade (Belo et al., 2013; Beugnet et al., 2018). A prevalência aumenta até aos 3 anos e novamente a partir dos 7-8 anos. Em cães jovens pode dever-se à suscetibilidade genética ou a vulnerabilidade imunológica, já nos animais mais velhos pode estar relacionado com o aparecimento de doenças concomitantes e com o declínio do seu sistema imunitário, que no caso dos animais que mantinham uma infecção assintomática, já não consegue controlar eficazmente o parasita no organismo. Também pode estar relacionado com o incremento do risco de exposição aos flebótomos infetados (Moreno & Alvar, 2002; Pennisi & Persichetti, 2018; Velez et al., 2019).

Todavia, relativamente ao risco de infecção, o estilo de vida do animal é o fator de risco epidemiológico mais importante. Um cão que habite no exterior, em zonas endémicas da doença, com condições climatéricas e ambientais favoráveis ao inseto vetor, está continuamente exposto ao parasita. Logo, cães com menos restrições ambientais, como os cães de guarda ou os cães pastores, apresentam maiores taxas de infecção (Moreno & Alvar, 2002; Belo et al., 2013; Beugnet et al., 2018; Velez et al., 2019).

1.3.3) Papel epidemiológico desempenhado por outras espécies

O ciclo doméstico é o principal ciclo epidemiológico da leishmaniose canina, sendo o cão (*Canis lupus familiaris*) o principal hospedeiro vertebrado deste ciclo (Gharbi et al., 2015; Abbehussen et al., 2017), contudo *L. infantum* também infeta canídeos selvagens, que formam um reservatório silvático, como o lobo (*Canis lupus*) e a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*). Também existem relatos de infecção em cavalos (*Equus caballus*) e gatos (*Felis catus*), mas são raros, embora o diagnóstico e o respetivo número de casos nos felídeos domésticos registe um incremento (Maia & Cardoso, 2015; Beugnet et al., 2018; Ribeiro et al., 2018).

Os canídeos selvagens são suspeitos de serem uma fonte secundária do parasita para os cães domésticos e para o homem, uma vez que podem ser infetantes para os insetos vetores. Contudo a sua relevância epidemiológica na transmissão da doença não está estabelecida (Ribeiro et al., 2018).

Os gatos domésticos raramente são infetados, como tal o conhecimento ainda é escasso quanto à suscetibilidade desta espécie à infecção por *L. infantum*, ao desenrolar da doença a nível clínico e à importância que desempenha na manutenção do ciclo de vida deste parasita (Ribeiro et al., 2018). Os casos relatados ocorreram com maior frequência em zonas endémicas de *L. infantum* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Maia & Campino, 2011; Pennisi &

Persichetti, 2018) e apenas esporadicamente em zonas livres do parasita no caso de gatos adotados (Pennisi & Persichetti, 2018). Aparentemente, a resposta imunitária dos gatos é suficientemente eficaz no controlo da infeção, visto que os animais infetados raramente apresentam sinais clínicos (Dalvi et al., 2018; Ribeiro et al., 2018). Ainda assim, os gatos infetados com sinais clínicos não recuperam sem tratamento adequado e este efeito protetor não se verifica em animais imunodeprimidos, como por exemplo, gatos com co-infeção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e com o vírus da leucemia felina (FeLV). A imunossupressão permite o alastrar da doença e facilita a transmissão do parasita. Desta forma, os gatos infetados podem ser uma fonte de *L. infantum* para os flebótomos e como tal, atuarem como hospedeiro acidental ou reservatório secundário do parasita (Gramiccia & Gradoni, 2005; Dalvi et al., 2018; Pennisi & Persichetti, 2018; Ribeiro et al., 2018). Contudo, é sugerido que os gatos devem ser protegidos contra as picadas do vetor, como parte da estratégia “One Health” de controlo da doença (Pennisi & Persichetti, 2018).

1.4) Morfologia

O género *Leishmania* é constituído por protozoários flagelados dimórficos (Beugnet & Chomel, 2013; Beugnet et al., 2018). *L. infantum* tem duas apresentações morfológicas distintas associadas às duas fases do seu ciclo de vida, a forma promastigota no hospedeiro invertebrado e a forma amastigota no hospedeiro vertebrado (Ayele & Seyoum, 2016).

- **Forma promastigota:** Protozoário extracelular e flagelado, com cerca de 2,5 µm de comprimento, está presente no aparelho digestivo do flebótomo, ou em meios de cultura apropriados (Ayele & Seyoum, 2016; Beugnet et al., 2018).

- **Forma amastigota:** Protozoário intracelular e não flagelado. Prolifera dentro do vacúolo parasitóforo no interior das células infetadas, maioritariamente os macrófagos. Tem uma forma oval ou arredondada, com 3-5 µm, com um núcleo de grandes dimensões e um cinetoplasto (Reguera, Morán, Pérez-Pertejo, García-Estrada, & Balaña-Fouce, 2016) (Fig. 3). Também pode localizar-se extracelularmente quando as células infetadas sofrem lise celular (Beugnet et al., 2018).

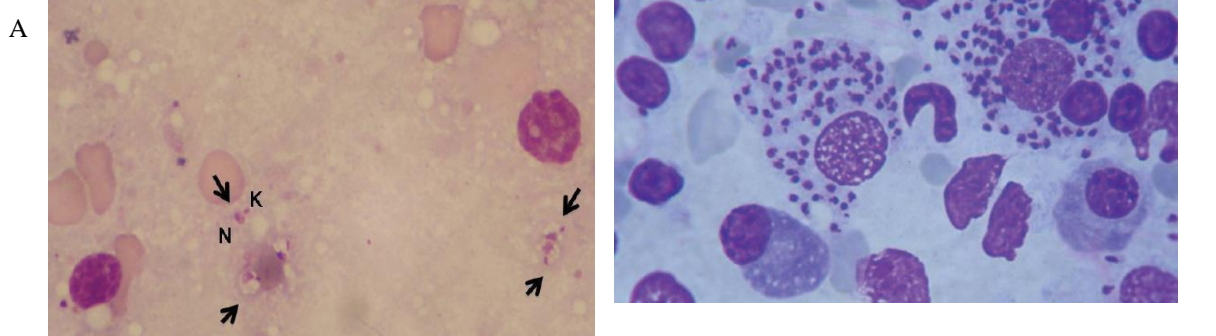


Figura 3: Amastigotas de *Leishmania infantum* A. (↗) Amastigotas de *Leishmania infantum* extracelularmente. Núcleo (N) e Cinetoplasto (K) (emSolano Gallego et al., 2011); B. Amastigotas de *Leishmania infantum* intra e extracelularmente (emSolano Gallego et al., 2011).

1.5) Transmissão e Ciclo de vida

O flebótomo pica o cão em zonas de pele glabra: na cabeça, focinho, pavilhão auricular, zonas inguinais e perianais (Solano-Gallego et al., 2009; Beugnet et al., 2018).

O ciclo de vida do parasita inicia-se quando um flebótomo pica e ingere o sangue de um hospedeiro vertebrado infetado com *Leishmania infantum*, o que leva o inseto a ingerir células fagocitárias com as formas amastigotas no seu interior. Estas vão para o aparelho digestivo do inseto, onde se multiplicam e começam a sua transformação morfológica na forma promastigota. (Dostálová & Volf, 2012). Alguns dias depois, os promastigotas migram até às partes bucais do flebótomo (Ayele & Seyoum, 2016) e são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado, através da probóscide do inseto (Beugnet & Chomel, 2013; Gharbi et al., 2015).

Os insetos hematófagos podem utilizar duas estratégias de alimentação. A alimentação solenofágica (ou “vessel-feeding”) que ocorre em piolhos, pulgas e mosquitos. Nestes grupos de insetos, as peças bucais formam estiletes longos, finos e perfurantes que conseguem perfurar diretamente os vasos sanguíneos. A segunda estratégia é a alimentação telmofágica (ou “pool-feeding”) encontrada em flebotomíneos, tabanídeos, simulídeos e moscas picadoras. Consiste na formação de uma microhemorragia “lago hemolinfático” formada pelo rompimento dos pequenos vasos pela ação das peças bucais destes insetos, adaptadas para rasgar, dilacerar ou cortar a pele do hospedeiro (Lehane et al., 2005).

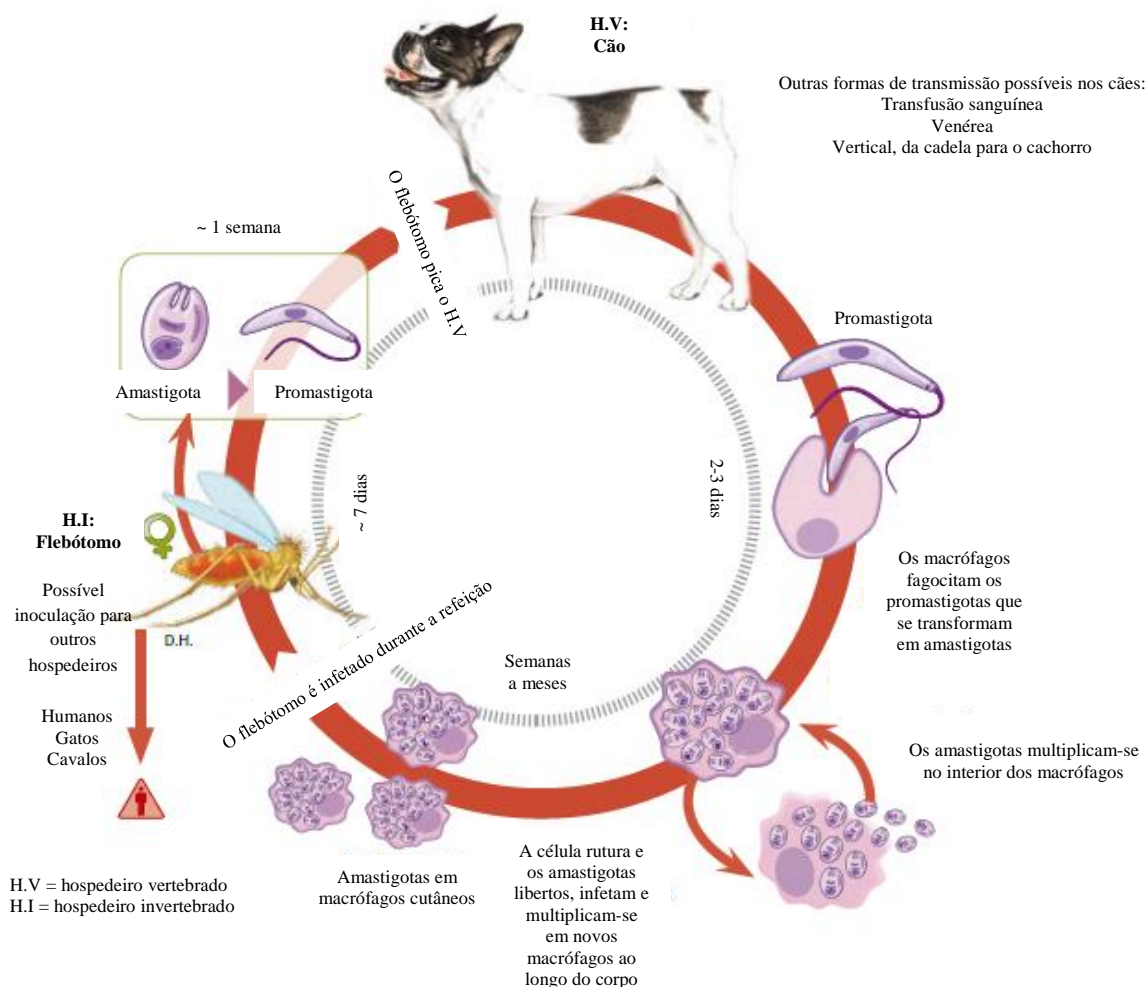
Assim, apesar de os flebótomos morderem, será utilizado na dissertação o termo picada, uma vez que é o mais vulgarizado relativamente a estes insetos. Durante a formação da microhemorragia, são injetadas biomoléculas com propriedades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras através da saliva do inseto (Willen & Petr Volf, 2018). Isto facilita a alimentação do flebótomo e a implantação do parasita no organismo do hospedeiro vertebrado, pois, por um lado, é garantido um fluxo contínuo de sangue no local e por outro as moléculas presentes na saliva são reconhecidas como antigénios pelo organismo o que estimula o mesmo a desenvolver uma resposta imunitária. Estes fatores permitem um contacto mais próximo entre os promastigotas e as células mononucleares fagocitárias, pois estas células deslocam-se através da corrente sanguínea e penetram nos tecidos para fagocitar os antigénios invasores (Beugnet et al., 2018) (Fig. 4).

Os promastigotas sobrevivem à fagocitose e às reações oxidativas que ocorrem no interior dos macrófagos (Beugnet et al., 2018), o que permite a sua transformação em amastigotas, que em seguida se multiplicam repetidamente por bipartição dentro dos macrófagos até estes ruturarem (Gharbi et al., 2015; Ribeiro et al., 2018), sendo depois fagocitados por novos macrófagos (Beugnet et al., 2018). Deste modo, os parasitas disseminam-se por todo o

organismo e invadem as células do sistema mononuclear fagocitário em numerosos órgãos, especialmente no baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Ribeiro et al., 2018) (Fig. 4).

O aparecimento de casos autóctones de CanL em locais onde não se provou a presença do inseto vetor aponta para a existência de outras formas de transmissão não envolvendo flebótomos, como por exemplo: transmissão por via sexual ou venérea, por via transplacentária ou vertical, por transfusão sanguínea ou de órgãos ou diretamente entre cães através de feridas (Karkamo, 2014; Maia & Cardoso, 2015; Rakhshanpour et al., 2017; Svobodova et al., 2017). A transmissão de *Leishmania* spp. pelas vias sexual e transplacentária já foi relatada em cães (Riera & Valladares, 1996; Naucke & Lorentz, 2012; Slimane et al., 2014), contudo a sua relevância ainda não está esclarecida (Slimane et al., 2014; Junior et al., 2017). Há relatos da presença de lesões genitais associadas à CanL e a transmissão por via sexual parece ser mais eficiente a partir do macho infetado para a fêmea. Relativamente à transmissão vertical, o parasita já foi detetado em diversas amostras, desde fetos abortados a neonatos (Silva et al., 2009; Junior et al., 2017; Ribeiro et al., 2018).

Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania infantum* (adaptado de Beugnet et al., 2018).



No ser humano, a transmissão do parasita por via sanguínea ocorre em casos de toxicodependência onde há troca de seringas entre indivíduos simultaneamente infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e *Leishmania infantum* (Morillas-Marquez et al., 2002; Miró & López-Vélez, 2018). Nos cães ocorre durante transfusões de sangue, pelo que a seleção adequada dos dadores é de extrema importância para prevenir a transmissão da doença (Solano-Gallego et al., 2011). Modos de transmissão que ainda não foram provados incluem: outros artrópodes hematófagos, como carraças e pulgas, devido a associação entre a presença destes vetores no ambiente e casos da CanL e transmissão direta entre cães através de feridas (Solano-Gallego et al., 2011; Naucke, Amelung & Lorentz, 2016; Reguera et al., 2016; Rakhshanpour et al., 2017).

1.6) Patogénese e Resposta imunitária

A patogenicidade de *L. infantum* resulta da infeção das células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado pelas formas amastigotas do parasita, o que origina desordens funcionais e eventualmente destruição de todos os tecidos, daí muitas vezes a designação dada à doença de leishmaniose canina generalizada (Beugnet et al., 2018).

Os mecanismos do sistema imunitário do cão responsáveis por conferir resistência ou suscetibilidade à infeção ainda não são suficientemente bem conhecidos, contudo a eficácia do sistema imunitário é crucial para definir a progressão da doença (Hosein, Blake, & Solano-Gallego, 2016; Abbehusen et al., 2017; Santos et al., 2019). Os animais podem ter respostas imunitárias muito variáveis (Hosein et al., 2016), consequentemente, alguns cães infectados podem desenvolver sinais e a doença pode progredir até a morte, ao passo que outros podem permanecer assintomáticos (Barbiéri, 2006).

A resistência à leishmaniose canina é mediada pela ação dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ do tipo Th1, que estimulam a produção das citocinas: interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), interferão-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α). Em particular, a IFN- γ e a TNF- α vão estimular os macrófagos a produzir óxido nítrico, responsável por provocar uma reação oxidativa intensa no interior destas células, o que culmina na sua apoptose e consequentemente na destruição dos amastigotas que estavam no seu interior (Barbiéri, 2006; Koutinas & Koutinas, 2014; Abbehusen et al., 2017; Beugnet et al., 2018; Santos et al., 2019). Os linfócitos T auxiliares CD4⁺ do tipo Th1 também são responsáveis por estimular os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ a provocar a lise dos macrófagos infectados ao induzirem a sua apoptose (Barbiéri, 2006).

Contudo, com a progressão da doença estes mecanismos eventualmente regridem (Hosein et al., 2016). Ainda assim, o período de incubação da doença pode variar entre 3 meses a vários anos após o início da infecção, o que demonstra a enorme variedade temporal existente na transição entre estados de resistência e de progressão da doença (Koutinas & Koutinas, 2014). A progressão da doença e o surgimento de sinais clínicos é geralmente caracterizado por uma resposta imunitária mediada por linfócitos T auxiliares do tipo Th2, que induzem a produção das citocinas, interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13) e o fator de transformação do crescimento tumoral beta (TGF- β). As citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β diminuem a resposta do tipo Th1, inibindo a produção de óxido nítrico e a ação microbicida dos macrófagos, o que leva a que os cães apresentem uma carga parasitária elevada (Baneth et al., 2008; Hosein et al., 2016; Santos et al., 2019). Para além disso, estas citocinas estimulam a proliferação exuberante dos linfócitos B (Koutinas & Koutinas, 2014), que produzem uma grande quantidade de anticorpos contra *L. infantum*, essencialmente do tipo IgG (Barbiéri, 2006; Beugnet et al., 2018).

A hipergamaglobulinemia policlonal não protege o animal, pois os anticorpos não conseguem inibir a multiplicação do parasita (Beugnet & Chomel, 2013), ao invés é prejudicial, pois leva à formação de imunocomplexos, através do excesso de anticorpos em circulação que se ligam aos antígenos. Estes complexos circulam pelo organismo e depositam-se em diversos tecidos e órgãos, provocando sinais imunopatológicos, como glomerulonefrite, vasculite, uveíte, miosite e poliartrite (Solano-Gallego et al., 2011; Manzillo et al., 2013; Koutinas & Koutinas, 2014). Há uma correlação positiva entre a quantidade de anticorpos, a densidade de parasitas nos tecidos e a gravidade dos sinais clínicos do animal (Hosein et al., 2016; Duthie, Lison & Courtenay, 2018).

O equilíbrio entre as respostas imunitárias Th1 e Th2 é crucial para a progressão da CanL, uma vez que todos os cães desenvolvem uma resposta mista (Panaro et al., 2009; Koutinas & Koutinas, 2014; Kaszak, 2015). Contudo este balanço é instável e animais resistentes podem tornar-se suscetíveis se a eficácia do seu sistema imunitário for comprometida (Baneth et al., 2008).

1.6.1) Outros fatores

A raça é um fator importante (Miró & López-Vélez, 2018), pois a genética influencia o tipo de resposta imunitária desenvolvida contra a infecção (Solano-Gallego et al., 2000; Santos et al., 2019). Aparentemente, a maior suscetibilidade de algumas raças à leishmaniose canina, como o Boxer, Rottweiler, Pastor Alemão (Miranda, Roura, Picado, Ferrer, & Ramis, 2008), Doberman Pinscher, Cocker Spaniel, English Foxhound e American Foxhound (Sanchez-Robert et al., 2008), está associada à existência de polimorfismos e mutações na expressão do gene *Slc11a1* (Solute carrier family 11 member a1; anteriormente *NRAMP1*) (Koutinas & Koutinas, 2014), que está envolvido na ativação dos macrófagos e no controle da replicação do parasita (Beugnet & Chomel, 2013; Hosein et al., 2016). Por outro lado, raças como o Poodle e o Yorkshire Terrier são afetadas com menos frequência (Miranda et al., 2008), assim como animais de raça indefinida ou raças autóctones de zonas endêmicas (Hosein et al., 2016; Velez et al., 2019). Um exemplo é a raça Podengo Ibicenco, que está relatada como sendo resistente à infecção por *L. infantum*, uma vez que, os indivíduos raramente apresentam sinais clínicos, pois desenvolvem uma resposta imunitária muito eficaz, predominantemente do tipo celular (Solano-Gallego et al., 2000; Barbiéri, 2006; Hosein et al., 2016).

1.7) Sinais clínicos

É impossível atribuir à leishmaniose canina um conjunto específico de sinais clínicos (Solano-Gallego et al., 2009; Ribeiro et al., 2013). Estes podem ser mais ou menos pronunciados e variam no período de tempo que levam a desenvolver-se (Beugnet et al., 2018).

Os sinais clínicos mencionados na anamnese e frequentemente observados durante o exame físico incluem: prostração, perda de peso, amiotrofia, lesões dermatológicas, onicogrifose, linfadenomegalia, poliúria, polidipsia, palidez das mucosas, lesões oculares, epistaxe, vômito, diarreia, pirexia esplenomegalia e hepatomegalia (Solano-Gallego et al., 2011; Bourdeau et al., 2014; Koutinas & Koutinas, 2014; Gharbi et al., 2015; Baxarias et al., 2018). A atrofia muscular afeta principalmente os músculos temporais e os masséteres. O animal fica com uma aparência característica de ‘cabeça de cão velho’ ou “cabeça de velha” (Ayele & Seyoum, 2016; Beugnet et al., 2018). De seguida, são afetados os músculos dos membros e da região pélvica e em consequência a estrutura óssea fica saliente (Beugnet et al., 2018) (Fig. 5). A linfadenomegalia é um dos sinais mais frequentes (Manzillo et al., 2013; Noli & Saridomichelakis, 2014; Gharbi et al., 2015) e surge cedo no decorrer da doença, podendo inclusive ser o único sinal (Gharbi et al., 2015). Pode afetar apenas um linfonodo ou vários

(Lima, Michalick, Melo, Tafuri, & Tafuri, 2004). No estudo desenvolvido por Lima et al. (2004) foi observado um aumento generalizado dos linfonodos, em particular dos cervicais, o que pode dever-se à sua posição anatômica, já que estão envolvidos na drenagem da cabeça e orelhas, locais onde predominantemente os cães são picados pelos flebótomos (Fig. 5).

Os sinais dermatológicos são igualmente comuns. Têm apresentações muito variáveis, sendo que um animal pode apresentar mais do que um sinal (Gharbi et al., 2015). As alterações dermatológicas mais frequentemente observadas em cães com CanL são: dermatite exfoliativa, dermatite ulcerativa e onicogribose (Ordeix et al., 2017).

A dermatite exfoliativa não é pruriginosa, e pode estar acompanhada ou não de alopecia, que pode ser generalizada ou localizada. É mais pronunciada na zona da face, em particular em torno dos olhos e orelhas (Blavier et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2009; Perego, Proverbio, De Gorgi & Spada, 2014; Beugnet et al., 2018). Pode estar associada com seborreia seca, caracterizada por numerosas crostas de grande dimensão e de aspeto brilhante acinzentado (descamação furfurácea), com odor característico a ranço (Blavier et al., 2001; Gharbi et al., 2015; Beugnet et al., 2018) (Fig. 5).

Na dermatite ulcerativa, as úlceras localizam-se frequentemente no pavilhão auricular, no local correspondente à inoculação do parasita pela picada do flebótomo (Blavier et al., 2001; Beugnet et al., 2018) (Fig. 5). Porém, também surgem em locais com proeminências ósseas, como no cotovelo; nos espaços interdigitais e nas almofadinhas plantares; no focinho e nas junções mucocutâneas (Solano-Gallego et al., 2009; Beugnet et al., 2018) (Fig. 5).

A onicogribose é um sinal característico que surge devido à multiplicação de *L. infantum* nos macrófagos localizados na matriz ungueal, o que provoca inflamação crónica do tecido e estimula o seu crescimento. São unhas que crescem de forma constante e com grande rapidez (Beugnet et al., 2018) (Fig. 5). Outras lesões dermatológicas menos comuns incluem: dermatite nodular, dermatite pustular (Perego et al., 2014; Ordeix et al., 2017), dermatite papular, despigmentação nasal, paniculite e hiperqueratose nasal (Solano-Gallego et al., 2009; Noli & Saridomichelakis, 2014; Gharbi et al., 2015) (Fig. 5).

Outros sinais surgem com frequência variável, tais como: lesões oculares, como conjuntivite, queratoconjuntivite, uveíte anterior e blefarite (Solano-Gallego et al., 2009; Pietro, Bosco, Crinò, Francaviglia, & Giudice, 2016; Beugnet et al., 2018) (Fig. 5); lesões no sistema músculoesquelético como poliartrite imunomediada, poliomiosite e lesões ósseas osteolíticas e sinais do sistema gastrointestinal, como nódulos orais, hepatite e colite crónica (Solano-Gallego et al., 2009; Noli & Saridomichelakis, 2014; Ayele & Seyoum, 2016). Formas atípicas da doença também já foram descritas, entre as quais, alterações neurológicas como a meningoencefalite (Solano-Gallego et al., 2009; Giannuzzi, Ricciardi, De Simone, &

Gernone, 2017; Beugnet et al., 2018) e alterações cardiorrespiratórias como vasculite, hiperviscosidade sanguínea, síncope, rinite, pneumonia, pericardite e tromboembolismo (Blavier et al., 2001). A formação e deposição de imunocomplexos origina a maioria das desordens mais graves da CanL, incluindo a doença renal crónica devido à glomerulonefrite e outras, como a poliartrite, uveíte, vasculite e meningite (Manzillo et al., 2013; Beugnet et al., 2018; Miró & López-Vélez, 2018).

Figura 5: Sinais clínicos da leishmaniose canina. **A.** Aumento do linfonodo poplíteo (em Beugnet & Chomel, 2013); **B.** Alopecia difusa e seborreia seca com descamação (em Beugnet et al., 2018); **C.** Úlceras no pavilhão auricular, que correspondem aos principais locais de picada do vetor (em Beugnet et al., 2018); **D.** Alopecia e onicogribose (em Beugnet et al., 2018); **E.** Úlcera no focinho (em Beugnet et al., 2018); **F.** Uveíte (em Beugnet & Chomel, 2013).



1.8) Alterações laboratoriais

As análises laboratoriais devem ser realizadas com rotina (Ribeiro et al., 2013). Alterações nos parâmetros laboratoriais podem alertar para a doença ou reforçar a sua suspeita (Paltrinieri, Gradoni, Roura, Zatelli, & Zini, 2016).

Um cão com suspeita de CanL deve realizar as seguintes análises laboratoriais: hemograma, análise do perfil bioquímico hepático e renal, eletroforetograma das proteínas séricas e urianálise (Beugnet et al., 2018). Apesar da inexistência de alterações específicas, as mais frequentemente detetadas são: anemia não regenerativa normocítica e normocrômica, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, diminuição do rácio globulina/albumina e proteinúria (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014; Miró & López-Vélez, 2018).

A anemia normocítica normocrômica é característica das doenças crónicas. Citoquinas libertadas durante o processo inflamatório levam a redução da eritropoietina com consequente diminuição da eritropoiese. A disproteinemia é uma das alterações mais significativas da doença e é representada frequentemente por hipergamaglobulinemia, devido ao elevado título de anticorpos em circulação. A albumina diminui, principalmente, devido à inflamação e ao aumento da sua excreção pelo rim, causada por danos nos glomérulos renais (Ribeiro et al., 2013; Paltrinieri et al., 2016; Ribeiro et al., 2018).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais produz alterações inflamatórias que levam à nefropatia com proteinúria, que progride para doença renal crónica, caracterizada por glomerulonefrite, nefrite túbulo-intersticial e azotemia (Baneth et al., 2008; Cortadellas, Fernández-del Palacio, Talavera, & Bayón, 2009; Paltrinieri et al., 2016). Visto a CanL ser uma doença que frequentemente provoca danos renais, torna-se essencial avaliar a função renal dos cães infetados com uma urianálise (Pierantozzi, Roura, Paltrinieri, Poggi, & Zatelli, 2013) e caracterizar o estágio da doença renal de acordo com as recomendações da International Renal Interest Society (IRIS) (Solano-Gallego et al., 2009).

Também podem surgir alterações no perfil de coagulação como trombocitopenia, disfunção plaquetária e fibrinólise (Baneth et al., 2008; Noli & Saridomichelakis, 2014).

Alterações bioquímicas podem incluir modificações nos valores das enzimas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (Heidarpour, Soltani, Mohri & Khoshnegah, 2012; Noli & Saridomichelakis, 2014; Miró & López-Vélez, 2018).

A enorme variedade e baixa especificidade dos sinais leva a que a lista de diagnósticos diferenciais para a CanL seja imensa (Solano-Gallego et al., 2011; Koutinas & Koutinas, 2014). Contudo, o aparecimento de um só sinal deve sempre alertar para a possibilidade desta doença, especialmente em zonas endémicas (Bourdeau et al., 2014; Beugnet et al., 2018).

1.9) Diagnóstico

O diagnóstico da infecção é fundamentalmente clínico ainda que seja apoiado em resultados laboratoriais. É importante que seja correto e precoce para se garantir o estabelecimento de um protocolo de tratamento adequado, para melhorar o prognóstico e para implementar medidas de controlo, o que por sua vez, reduz a transmissão do parasita (Gómez-Ochoa et al., 2003; Mohammadiha et al., 2013; Gharbi et al., 2015).

O diagnóstico da infecção não equivale ao da doença, os resultados dos testes de diagnóstico diferem substancialmente entre os cães doentes e os com infecção subclínica (Noli & Saridomichelakis, 2014).

A lista de diagnósticos diferenciais é extensa e inclui: outras doenças parasitárias, doenças infecciosas, endocrinopatias e doenças auto-imunes (Bourdeau et al., 2014). Assim, a abordagem de diagnóstico deve ser única para cada paciente (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014), contudo, a anamnese, exame físico e diversos testes laboratoriais já mencionados são essenciais e devem ser sempre avaliados em conjunto (Solano-Gallego et al., 2009; Vulpiani, Iannetti, Paganico, Iannino, & Ferri, 2011).

Ao longo do tempo foram desenvolvidas diversas técnicas para facilitar a obtenção de um diagnóstico definitivo, sendo que para tal, é importante usar mais do que uma (Kaszak et al., 2015), visto nenhuma ter 100% de especificidade e sensibilidade (Solano-Gallego et al., 2014).

1.9.1) Técnicas parasitológicas

A citologia é usada principalmente em cães que apresentam sinais clínicos e alterações clinico-patológicas típicas da leishmaniose canina. Baseia-se na observação direta do parasita, em particular da sua forma amastigota com recurso à microscopia ótica (Solano-Gallego et al., 2009; Ayele & Seyoum, 2016). Permite observar os amastigotas no interior dos macrófagos ou a nível extracelular em caso de lise celular (Sundar & Rai, 2002; Paltrinieri et al., 2016), sendo que, a deteção do parasita é considerada conclusiva em termos de diagnóstico (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva, & Baneth, 2008; Vulpiani et al., 2011). É uma técnica com uma especificidade absoluta (Noli & Saridomichelakis, 2014) e é o método mais simples e barato de alcançar o diagnóstico (Mohammadiha et al., 2013; Ayele & Seyoum, 2016).

Deve ser usada em animais sintomáticos, com lesões cutâneas, como úlceras e nódulos (Paltrinieri et al., 2016), sendo que, as amostras podem ser colhidas por raspagem das lesões ou por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (Sundar & Rai, 2002), o que as torna técnicas pouco invasivas (Noli & Saridomichelakis, 2014). Os fluidos biológicos como o

líquido sinovial e o líquido cefalorraquidiano também podem ser usados (Paltrinieri et al., 2016), já os esfregaços realizados a partir de sangue periférico têm baixo valor diagnóstico, pois é raramente se observam os parasitas que estão em circulação (Beugnet et al., 2018).

Nos cães suspeitos, mas sem sinais cutâneos, a amostra deve ser obtida por biópsia de um tecido rico em macrófagos como a medula óssea, linfonodos ou o baço (Solano-Gallego et al., 2009; Vulpiani et al., 2011; Ayele & Seyoum, 2016; Paltrinieri et al., 2016) e a PAAF de linfonodo é a técnica mais usada pois é um processo pouco invasivo, relativamente indolor, facilmente executável e garante o diagnóstico na maioria dos casos (Noli & Saridomichelakis, 2014; Beugnet et al., 2018). Este método aumenta a sensibilidade da técnica (Miró et al., 2008) e simultaneamente pode revelar a presença de lesões microscópicas compatíveis com a CanL (Paltrinieri et al., 2016), tipicamente, uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de amastigotas dentro dos macrófagos (Hosein et al., 2016). Todavia, estas lesões não são específicas e não permitem o diagnóstico definitivo na ausência de uma observação direta dos amastigotas (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Assim, a citologia é uma técnica com baixa sensibilidade, já que, a observação direta do parasita é difícil, especialmente em cães assintomáticos, que têm cargas parasitárias reduzidas (Mettler, Grimm, Capelli, Camp & Deplazes, 2005; Miró et al., 2008; Saridomichelakis, 2009; Ayele & Seyoum, 2016). A ausência de parasitas não deve ser interpretada como um diagnóstico definitivo, nestes casos devem ser realizados outros testes que tenham uma maior sensibilidade (Gharbi et al., 2015; Paltrinieri et al., 2016).

1.9.2) Técnicas serológicas

O immunofluorescence antibody test (IFAT) é uma técnica que usa geralmente como antígenos a forma promastigota do parasita (Solano-Gallego et al., 2014; Paltrinieri et al., 2016), o que lhe dá uma elevada sensibilidade e especificidade, daí que seja considerado o método serológico de referência no diagnóstico da CanL (Ayele & Seyoum, 2016; Mettler et al., 2016; Paltrinieri et al., 2016).

Por sua vez, o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) permite a utilização de diferentes antígenos, desde extratos purificados de ambas as formas do parasita, a proteínas recombinantes (Miró et al., 2008; Santarém et al., 2010; Mettler et al., 2016). Permite a análise rápida de um grande número de amostras, porém, é menos precisa que o IFAT (Ayele & Seyoum, 2016; Paltrinieri et al., 2016).

Ambos são testes serológicos quantitativos que estimam o título de anticorpos específicos contra o parasita (Paltrinieri et al., 2016), o que os torna mais eficazes em infecções

sintomáticas, devido à marcada resposta humoral (Lombardo et al., 2012; Noli & Saridomichelakis, 2014). Também são usados com frequência em estudos epidemiológicos para a determinação da seroprevalência da infecção (Ayele & Seyoum, 2016; Faria et al., 2017). Ainda assim, têm limitações: possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o protozoário *Trypanosoma cruzi* em zonas endêmicas para ambos os parasitas. Estas reações ocorrem quando os anticorpos produzidos pelo sistema imunitário não são específicos e diferenciados para antigénios provenientes de parasitas diferentes o que pode originar resultados falsos-positivos (Solano-Gallego et al., 2014; Paltrinieri et al., 2016; Selder, Weber, Bergmann, Geisweid & Hartmann, 2018) e baixa sensibilidade na fase precoce da doença e na deteção dos animais assintomáticos (Gharbi et al., 2015; Mettler et al., 2016; Travi, Cordeiro-da-Silva, Dantas-Torres, & Miró, 2018).

Assim, estes testes devem ser realizados quando existe uma forte suspeita clínica da doença e as técnicas citológicas não foram eficazes (Paltrinieri et al., 2016). Um título elevado de anticorpos confirma o diagnóstico em cães com sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais compatíveis com CanL (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014; Kaszak et al., 2015). Ainda assim, a presença de um título baixo, com sinais clínicos compatíveis não exclui a doença, sendo necessário e relevante realizar mais testes (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2014; Kaszak et al., 2015).

Em ambiente hospitalar, podem-se usar immunochromatographic tests (ICT) que não necessitam de pessoal treinado em práticas laboratoriais para os interpretar e providenciam resultados qualitativos rapidamente. Estão disponíveis em kits comerciais e usam antigénios purificados ou recombinantes do parasita e podem ser usadas diversas amostras biológicas, como o plasma, soro e sangue total (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2014; Fraga et al., 2016; Paltrinieri et al., 2016).

A especificidade destes testes é geralmente alta, daí que sejam bastante eficazes e fiáveis a detetar animais não infetados, no entanto, a sua sensibilidade é muito variável, sendo superior em cães sintomáticos, deste modo, no caso de resultados positivos, estes devem ser confirmados através de outras técnicas laboratoriais (Solano-Gallego et al., 2014; Paltrinieri et al., 2016).

As técnicas serológicas não são adequadas para monitorizar o animal após o tratamento, pois o título de anticorpos anti-*Leishmania* permanece detetável durante um longo período de tempo (Ayele & Seyoum, 2016). Todavia, são úteis para avaliar o prognóstico da doença, um título elevado está frequentemente associado a um prognóstico negativo e recaídas após o tratamento, enquanto um título baixo é característico de uma evolução positiva (Beugnet & Chomel, 2013).

1.9.3) Técnicas moleculares

São baseadas na técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e têm uma sensibilidade superior à serologia na detecção dos animais assintomáticos (Strauss-Ayali, Jaffe, Burshtain, Gonen & Baneth, 2004; Miró et al., 2008; Carson et al., 2010; Vulpiani et al., 2011).

Existem ensaios distintos com várias sequências alvo, usando DNA genômico ou do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum*. Os ensaios com kDNA aparentam ser os mais sensíveis para a detecção do parasita nos tecidos infetados, uma vez que o cinetoplasto possui milhares de cópias dos minicírculos de DNA (Sundar & Rai, 2002; Miró et al., 2008; Mohammadiha et al., 2013; Paltrinieri et al., 2016).

Atualmente estão disponíveis três técnicas diferentes de PCR: o PCR convencional (cPCR), nested-PCR e “real-time” PCR (qPCR) (Miró et al., 2008; Paltrinieri et al., 2016). O “real-time” PCR é considerado o método mais fiável de diagnóstico pois é a técnica com a maior sensibilidade (Carson et al., 2010; Mohammadiha et al., 2013; Noli & Saridomichelakis, 2014; Duthie et al., 2018). É uma técnica quantitativa que deteta cargas parasitárias extremamente baixas comparativamente com o cPCR e o nested-PCR e fornece informação acerca do número de cópias de DNA presentes na amostra o que é importante para o acompanhamento e monitorização da infeção durante o tratamento (Solano-Gallego et al., 2009; Noli & Saridomichelakis, 2014; Kaszak et al., 2015; Paltrinieri et al., 2016), assim como, para programas de vigilância e estudos epidemiológicos (Duthie et al., 2018).

A técnica de PCR pode ser aplicada em qualquer tecido e fluido biológico (Solano-Gallego et al., 2011; Paltrinieri et al., 2016), sendo que as amostras de medula óssea e linfonodo são as mais eficazes, independentemente do estado clínico do animal (Lombardo et al., 2012; Selder et al., 2018). Contudo, estudos recentes relatam que a colheita de amostras usando métodos não invasivos (por exemplo, amostras da conjuntiva, mucosa nasal e oral), podem ser sensíveis e específicos para a detecção do DNA do parasita em cães sintomáticos (Strauss-Ayali et al., 2004; Lombardo et al., 2012; Selder et al., 2018).

A detecção do DNA de *L. infantum* nos tecidos de cães clinicamente saudáveis a viver em zonas endémicas indica que estes estão infetados, ainda assim, podem nunca desenvolver sinais clínicos, daí que a correlação entre a infeção e a doença deva ser baseada na existência de sinais clínicos e alterações laboratoriais compatíveis com a CanL (Solano-Gallego et al., 2011; Paltrinieri et al., 2016). É recomendado que as técnicas moleculares apenas sejam usadas nos cães suspeitos de leishmaniose canina quando a infeção não puder ser comprovada através de outros testes e quando os principais diagnósticos diferenciais tiverem sido descartados (Noli & Saridomichelakis, 2014).

1.10) Tratamento

O tratamento tem como objetivo controlar os sinais clínicos da doença e aumentar a esperança média de vida (Noli & Saridomichelakis, 2014). Para além disso, é essencial para diminuir a carga parasitária no organismo do animal e desse modo reduzir a sua infeciosidade para os flebótomos e consequentemente o risco de transmissão da infeção para outros cães e para os seres humanos (Koutinas et al., 2001; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Yasur-Landau, Jaffe, David & Baneth, 2016).

Estão disponíveis diferentes protocolos de tratamento de acordo com distintos estádios clínicos. Estes estádios são estabelecidos com base nos resultados obtidos durante a avaliação clínica, e classificam a doença de acordo com a gravidade dos sinais clínicos, alterações laboratoriais e perfil serológico. Este agrupamento dos animais é importante para o estabelecimento de um tratamento mais preciso (Solano-Gallego et al., 2011; Bourdeau et al., 2014; Noli & Saridomichelakis, 2014; Proverbio, Perego & Spada, 2016). Existem dois sistemas de categorização dos estádios clínicos, simples e úteis em contexto clínico e com uma boa concordância entre si. O sistema desenvolvido pelo LeishVet group (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014; Proverbio et al., 2016) e o sistema do Canine Leishmaniasis Working Group (CLWG) (Paltrinieri et al., 2010; Roura et al., 2013).

O tratamento usualmente leva a um decréscimo da carga parasitária, contudo é extremamente difícil alcançar a eliminação total dos parasitas. Devido a isto, a maioria dos tratamentos de curto prazo são seguidos de recaídas no ano seguinte à sua descontinuação (Noli & Saridomichelakis, 2014; Ayele & Seyoum, 2016).

A combinação de antimonio de meglumina (Glucantime®, Merial) com alopurinol é considerada a terapêutica mais eficaz e trata-se do protocolo mais frequentemente utilizado (Gómez-ocha et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009; Farca et al., 2012; Kaszak et al., 2015; Santos et al., 2019). O antimonio tem atividade leishmanicida ao aumentar a capacidade fagocitária dos macrófagos (Manna et al., 2015). O alopurinol é considerado o medicamento de primeira linha para o tratamento a longo prazo da doença (Solano-Gallego et al., 2011; Manna et al., 2015). É um leishmanioestático metabolizado por *L. infantum* e forma um composto tóxico análogo ao ATP que se incorpora no ácido ribonucleico (RNA) do parasita e inibe a sua síntese proteica (Noli & Auxilia, 2005; Miró et al., 2009). A sua administração a longo prazo mantém no organismo do cão uma carga parasitária reduzida, prevenindo recaídas (Manna et al., 2015), daí ser usado para manutenção do tratamento após o uso de antimonio de meglumina (Ikeda-Garcia et al., 2010).

O antimoníaco de meglumina é administrado por via subcutânea, 2 vezes ao dia (BID) com a dose 40-75 mg/kg ou 1 vez ao dia (SID) com a dose 75-100 mg/kg, durante 4-8 semanas. O alopurinol é usado em conjunto na dose de 10mg/kg por via oral (PO), BID, durante 6 meses no mínimo (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomechelakis, 2014; Kaszak et al., 2015; Manna et al., 2015; Travi & Miró, 2018). Com este protocolo os cães apresentam uma melhoria acentuada dos seus sinais clínicos e remissão dos parâmetros laboratoriais para valores normais assim como um prognóstico mais favorável (Reguera et al., 2016).

O antimoníaco de meglumina é nefrotóxico, provoca abscessos cutâneos, letargia, anorexia, vômitos, diarreia, inflamação e dor no local da injeção (Solano-Gallego et al., 2011; Farca et al., 2012; Bourdeau et al., 2014; Gharbi et al., 2015; Pineda et al., 2017). O alopurinol leva à formação de cristais de xantina em quase todos os cães, e ocasionalmente ao desenvolvimento de urolitíase por xantínúria, o que secundariamente pode provocar azotemia pós-renal com consequente disfunção renal (Solano-Gallego et al., 2011; Gharbi et al., 2015; Reguera et al., 2016; Torres et al., 2016; Pineda et al., 2017).

A miltefosina (Milteforan®, Virbac) em combinação com o alopurinol é a segunda opção de tratamento para a CanL. Empregue com a dose de 2 mg/kg, PO, SID, durante 4 semanas (Solano-Gallego et al., 2011; Vulpiani et al., 2011; Noli & Saridomechelakis, 2014; Gharbi et al., 2015; Santos et al., 2019). A miltefosina perturba a síntese da membrana celular, provocando morte celular por apoptose (Miró et al., 2009). É vantajosa, porque é administrada PO e tem baixa toxicidade (Vulpiani et al., 2011), porém a taxa de recaídas é superior à verificada após o tratamento com antimoníaco de meglumina com alopurinol (Manna et al., 2015). O seu uso é recomendado para o tratamento de cães com efeitos secundários e resistências causadas pelo uso de antimoníaco de meglumina (Reguera et al., 2016; Beugnet et al., 2018). A miltefosina pode provocar perturbações gastrointestinais, vômitos e diarreia, assim como fetotoxicidade e teratogenicidade. (Solano-Gallego et al., 2011; Beugnet & Chomel, 2013; Reguera et al., 2016).

A combinação dos fármacos já abordados com o uso de imunomoduladores é uma tendência em desenvolvimento (Gómez-Ochoa et al., 2009; Ribeiro et al., 2018), o objetivo é reduzir a carga parasitária ao estabelecer uma resposta imunitária mais eficaz. Como exemplo, existe a domperidona (Motilium®, Leishguard®) (Sabaté, Llinás, Sust & Ferrer, 2014), um agente imuno-estimulador recomendado em medicina veterinária como agente profilático e imunoterapêutico, como monoterapia ou em combinação com outros fármacos (Travi & Miró, 2018). Especificamente estimula a imunidade celular e respostas mediadas por linfócitos T auxiliares do tipo Th1 com a produção das citocinas IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α (Gómez-Ochoa et al., 2009; Noli & Saridomechelakis, 2014; Sabaté et al., 2014; Travi & Miró, 2018).

1.11) Monitorização

O alívio dos sinais clínicos e a redução da carga parasitária indicam que o tratamento teve sucesso (Duthie et al., 2018), contudo, uma vez que a eliminação completa do parasita é rara, é importante monitorizar regularmente os cães tratados com avaliações clínicas e testes serológicos (Gharbi et al., 2015; Reguera et al., 2016). Tipicamente os cães são avaliados com uma frequência concordante com a gravidade dos sinais clínicos e o estágio da doença (Solano-Gallego et al., 2009), porém, todos os animais afetados devem ser monitorizados com um exame físico completo e uma avaliação dos parâmetros laboratoriais (Roura et al., 2013; Noli & Saridomichelakis, 2014; Kaszak et al., 2015). Na maioria dos casos a primeira avaliação é efetuada 1 mês após o início do tratamento e depois a cada 3-4 meses até os sinais clínicos desaparecerem. Depois, a cada 6-12 meses (Solano-Gallego et al., 2011; Noli & Saridomichelakis, 2014).

Deve ser realizada uma avaliação serológica 6 meses após o início do tratamento e depois a cada 6-12 meses (Noli & Saridomichelakis, 2014). O real-time PCR pode ser realizado em simultâneo com a serologia (Solano-Gallego et al., 2011; Roura et al., 2013) devido à sua elevada sensibilidade é um bom método para avaliar a eficácia do tratamento e para monitorizar o animal (Koutinas et al., 2001; Noli & Saridomichelakis, 2014).

1.12) Prognóstico

O diagnóstico precoce da doença é crucial para um bom prognóstico (Lladró, Picado, Ballart, Portús & Gállego, 2016). No geral, o prognóstico depende da gravidade dos sinais clínicos (especialmente os relacionados com a função renal) e da resposta do animal ao protocolo de tratamento (Noli & Auxilia, 2005; Roura et al., 2013; Miró & López-Vélez, 2018).

Na fase precoce da doença, as alterações renais podem ser reversíveis, contudo são indicativas de um mau prognóstico, uma vez que a insuficiência renal é a causa mais comum de morte em cães com CanL (Solano-Gallego et al., 2011; Miró & López-Vélez, 2018; Pereira et al., 2019). Assim, a proteinúria parece ser indicativa de um mau prognóstico e o seu controlo deve ter início assim que possível. Igualmente, a medição dos valores de creatinina e albumina é essencial pois são parâmetros importantes no controlo da função renal. Outros parâmetros indicativos de um prognóstico negativo são a existência de anemia, hipoalbuminemia e linfopenia (Geisweid, Mueller, Sauter-Louis & Hartmann, 2014; Pereira et al., 2019). A esperança média de vida dos cães doentes que recebem tratamento varia entre os 2 e os 5 anos após o diagnóstico, porém está a aumentar, particularmente na ausência de disfunção renal, devido aos avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento (Roura et al., 2013; Bourdeau et al., 2014; Noli & Saridomechelakis, 2014).

1.13) Controlo e Prevenção

O controlo e prevenção da CanL são essenciais para a saúde animal e humana (Gharbi et al., 2015; Ayele & Seyoum, 2016; Duthie et al., 2018).

Um dos métodos de controlo da doença envolve o rastreio dos cães a viver em zonas endémicas a cada 6-12 meses, para procurar a existência de anticorpos contra *Leishmania infantum*. O objetivo é detetar a infeção precocemente e desse modo instituir medidas adequadas de terapêutica e prevenção. Para além dos testes serológicos, os testes de diagnóstico molecular podem também ser usados para rastreio (Solano-Gallego et al., 2011).

O tratamento dos animais infetados também é um método relevante, contudo, os métodos de prevenção mais usados são os inseticidas tópicos e as vacinas (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Ayele & Seyoum, 2016). Os inseticidas tópicos repelentes são considerados o método mais importante, sendo que, ajudam a prevenir as infeções pois reduzem as picadas dos insetos vetores, já a vacinação pretende impedir o desenvolvimento da infeção após o contacto com o flebótomo infetado (Miró et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011; Brianti et al., 2016).

A picada do flebótomo é a via de transmissão mais importante, pelo que, as medidas de controlo devem focar-se principalmente na prevenção do contacto com o inseto (Brianti et al., 2016; Ribeiro et al., 2018).

1.13.1) Inseticidas tópicos

São o método mais eficaz e como tal a primeira opção para a prevenção da CanL (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Gálvez et al., 2018). São produtos de uso veterinário que contém piretroídes sintéticos, como a permetrina, deltametrina e flumetrina (Dantas-Torres, Miró, Bowman, Gradoni & Otranto, 2018; Miró & López-Vélez, 2018; Ribeiro et al., 2018). Estão disponíveis em coleiras, formulações spot-on e em sprays (Vulpiani et al., 2011; Gálvez et al., 2018; Miró & López-Vélez, 2018). Têm um efeito tóxico e irritante nos flebótomos, que ficam desorientados e morrem pouco tempo depois da exposição ao produto. Usualmente não chegam a picar o cão, o que previne a transmissão do parasita (Vulpiani et al., 2011; Otranto & Dantas-Torres, 2013).

As coleiras impregnadas com deltametrina controlam as picadas dos flebótomos (*P. perniciosus*) durante um período máximo de 6 meses, já as formulações em spray ou spot-on apenas são eficazes durante 2-3 semanas, respetivamente, pelo que, devem ser aplicadas mensalmente (Solano-Gallego et al., 2011; Vulpiani et al., 2011; Gálvez et al., 2018). As formulações tópicas spot-on precisam de 24-48h para que o inseticida se espalhe através do

estrato córneo da pele, enquanto os sprays têm um efeito imediato, contudo menos persistente (Vulpiani et al., 2011; Gálvez et al., 2018).

Os produtos mais comuns são coleiras contendo 4% deltametrina (Scalibor®, MSD Animal Health), 10% imidacloprida e 4,5% de flumetrina (Seresto®) e a formulação spot-on com 10% imidacloprida e 50% permetrina (Advantix®, Bayer) (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Brianti et al., 2016).

Os estudos desenvolvidos por Brianti et al. (2016), Coura-Vital et al. (2018), Kazimoto et al. (2018) e Paulin, Frénais, Thomas & Baldwin (2018) demonstraram que o uso de coleiras impregnadas com inseticida é um método eficaz na redução da CanL e sugerem a implementação do seu uso em larga escala como método de controlo.

O uso destes produtos deve ser encorajado não só em animais sem a infeção mas também em animais com infeção assintomática e em cães que realizaram o tratamento. Tal como demonstrou o estudo de Laurenti et al. (2013), os animais assintomáticos desempenham um papel importante na epidemiologia da CanL pois mantêm o ciclo de vida do parasita e garantem a sua transmissão em áreas endémicas.

1.13.2) Inseticidas ambientais e outras medidas de prevenção

Outras medidas úteis incluem: manter os cães no interior das habitações durante os meses de atividade dos insetos, desde o anoitecer ao amanhecer; reduzir ou se possível destruir os microhabitats favoráveis aos flebótomos (Solano-Gallego et al., 2011; Kaszak et al., 2015); usar barreiras físicas (redes finas nos canis e janelas), que não permitam a entrada dos insetos; evitar a construção de habitações em redor de florestas, evitar a importação de animais de países ou zonas endémicas (Ayele & Seyoum, 2016; Gálvez et al., 2018; Ribeiro et al., 2018); garantir que o lixo doméstico é devidamente recolhido (Gharbi et al., 2018); não utilizar cães infetados como dadores de sangue e evitar usar estes animais como reprodutores (Miró & López-Vélez, 2018).

O uso de inseticidas ambientais, nos locais de desenvolvimento das larvas não é factível devido a sua grande variedade, para além disso, pode ter efeitos nefastos em outras espécies de insetos. Também está indicado que aplicar sprays inseticidas nas paredes das casas é ineficaz, pois o efeito residual é muito curto, contudo, podem ser úteis em situações particulares, como quando existe uma elevada densidade de flebótomos perto ou no interior das habitações, ou no interior de canis, galinheiros, estábulos e adegas (Vulpiani et al., 2011; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Ayele & Seyoum, 2016; Gálvez et al., 2018).

1.13.3) Eutanásia

Em algumas zonas endémicas, um dos métodos de controlo é a eutanásia de todos os cães seropositivos (Gharbi et al., 2015; Travi et al., 2018). Esta abordagem foi implementada em países como o Brasil e a China. Porém, diversos estudos concluíram que se trata de um método cientificamente infundado (Dantas-Torres et al., 2018; Ribeiro et al., 2018). Os programas implementados não tiveram sucesso, em parte devido à elevada prevalência e incidência da infeção nesses locais, à dificuldade em diagnosticar os cães, principalmente devido ao uso de técnicas com baixa sensibilidade e especificidade e a rapidez com que os cães submetidos a eutanásia eram substituídos por novos animais suscetíveis (Gharbi et al., 2015; Gomez & Picado, 2017; Dantas-Torres et al., 2018).

Para além disso, o número de casos de leishmaniose em seres humanos permaneceu elevado (Vulpiani et al., 2011; Ayele & Seyoum, 2016), pelo que, este método está atualmente a ser substituído por estratégias mais eficazes. Uma boa nutrição, acesso a habitações com boas condições de salubridade e a cuidados de saúde básicos é essencial nestas áreas (Dantas-Torres et al., 2018).

Ainda assim, devido ao carácter zoonótico do parasita e ao papel do cão doméstico como reservatório da doença para o homem, a eutanásia deve ser recomendada aos animais bastante debilitados, especialmente aqueles que apresentem lesões externas (Beugnet et al., 2018) e também aqueles que contactem com pessoas imunodeprimidas (Beugnet & Chomel, 2013).

1.13.4) Novos métodos de controlo

Inseticidas sistémicos facilmente administrados PO podem ser usados como alternativa ou para complementar o controlo da CanL (Gomez et al., 2018). Para garantir a máxima eficácia e aderência a estes produtos, estes inseticidas devem ser fáceis de aplicar e devem ter um efeito de longa duração (Gomez & Picado, 2017).

Também estão em desenvolvimento, estudos *in vitro*, sobre a eficácia repelente e inseticida de extratos de plantas, que prometem ter um reduzido impacto ambiental e baixa toxicidade para os cães (Gálvez et al., 2018).

Por último, uma área com potencial é o controlo biológico dos flebótomos com recurso a outros seres vivos como bactérias, fungos e nemátodos. O valor deste método pode ser limitado devido a diversidade de habitats de crescimento larvar, daí que sejam necessários mais estudos para avaliar a sua aplicabilidade e eficácia (Gálvez et al., 2018).

1.14) Vacinação

O uso de vacinas anti-*Leishmania* nos cães pode ser o método mais prático e eficiente para a prevenção, controlo e possivelmente para a erradicação da doença em zonas endémicas (Moreno & Alvar, 2002; Vulpiani et al., 2011).

O consenso é que o programa de controlo ideal para a CanL envolve o uso combinado de vacinas e de inseticidas tópicos repelentes de modo a maximizar a proteção dos cães (Oliva et al., 2014; Cotrina et al., 2018), consequentemente constitui também uma estratégia muito importante para reduzir o perigo de transmissão da infeção para o ser humano (Miró et al., 2008), ajudando a diminuir o número de casos de CanL e de VL (Moreira et al., 2016) e assim a taxa de mortalidade tanto em cães como nos seres humanos (Toepp et al., 2018).

Recentemente, as vacinas têm sido encaradas como uma opção viável de imunoterapia. Esta função baseia-se na capacidade do antigénio presente na vacina controlar a resposta imunitária do organismo e auxiliar no desenvolvimento de uma resposta protetora, o que auxilia no controlo da progressão da doença em animais seropositivos mas assintomáticos. Isto aliado ao facto de que os efeitos adversos são limitados, leva a que se trate de uma opção terapêutica que predomina nos testes e investigações levadas a cabo por farmacêuticas (Toepp et al. 2018).

Assim, o objetivo é obter vacinas que estimulem o sistema imunitário do cão de modo a prevenir a infeção no animal e a progressão da doença a longo-prazo. Adicionalmente, devem ajudar a bloquear o ciclo de vida do parasita e consequentemente a sua transmissão, reduzindo desse modo a prevalência e a incidência da CanL (Bongiorno et al., 2013; Oliva et al., 2014; Reguera et al., 2016; Viana et al., 2018).

Sendo a CanL uma doença zoonótica, os cães são um modelo útil para compreender como a imunomodulação pode ter impacto no estabelecimento da infeção e na sua progressão. Apesar de ainda não existirem, atualmente, vacinas licenciadas para uso em seres humanos, existem três de uso veterinário (Toepp et al., 2018).

1.14.1) Mecanismo imunológico

O fator determinante para o desfecho da infecção é a capacidade com que o sistema imunitário controla eficazmente a multiplicação do parasita. A resistência à progressão da doença está primariamente dependente do desencadear de uma resposta imunitária predominantemente do tipo celular, mediada principalmente pelos linfócitos T auxiliares do tipo Th1 (Oliva et al., 2014; Gradoni, 2015), com consequente aumento das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12. Estes mediadores, em particular o IFN- γ e TNF- α promovem o desencadear da destruição intracelular dos amastigotas através da ativação da atividade leishmanicida dos macrófagos que produzem óxido nítrico, assim como através da ativação dos linfócitos citotóxicos CD8+ (Reguera et al., 2016). Por outro lado, a suscetibilidade à doença e o aparecimento de sinais clínicos, resulta principalmente de uma resposta imunitária mediada por linfócitos T do tipo Th2, que não é protetora e permite um crescimento descontrolado dos parasitas (Oliva et al., 2014). Estão envolvidas uma mistura de citocinas produzidas por linfócitos T do tipo Th1 e Th2, com predominância das últimas como as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e TGF- β (Reguera et al., 2016), com efeitos na diminuição da resposta do tipo Th1 e na proliferação abundante de anticorpos.

Assim, uma vacina eficaz deve induzir uma resposta imunitária do tipo Th1, marcada e de longa duração de modo a controlar não só a progressão da infecção, mas também a transmissibilidade do parasita pelos flebótomos (Gradoni, 2015).

1.13.2) Adjuvantes

O adjuvante adicionado às vacinas tem um papel importante na indução da resposta ao antígeno e no seu reconhecimento pelo sistema imunitário. Daí que, a escolha do adjuvante seja extremamente importante na formulação de vacinas contra a CanL (Miró et al., 2008).

É esperada uma resposta imunoestimulante aditiva ou sinérgica mediada por linfócitos T do tipo Th1 quando os antígenos escolhidos para compor a vacina são formulados com adjuvantes (Reguera et al., 2016).

Todavia, os adjuvantes são responsáveis por efeitos secundários desagradáveis, maioritariamente no local de injeção, mas também estão na origem de efeitos graves a nível sistémico que podem condicionar o uso destes produtos nas formulações vacinais (Reguera et al., 2016).

1.14.3) Vacinas

Foram testados diversos tipos de vacinas nos cães: inativadas, purificadas, recombinantes ou vacinas de DNA. As baseadas em antígenos recombinantes ou nos seus produtos de excreção/secreção (ESP) do parasita, são as que demonstraram melhores resultados e que atualmente são comercializadas (Beugnet et al., 2018; Miró & López-Vélez, 2018).

As vacinas são usadas atualmente para a imunização ativa de cães seronegativos a partir dos 6 meses de idade, para reduzir o risco de desenvolverem doença clínica após contacto com o parasita (Beugnet et al., 2018).

As recomendações dos fabricantes relativamente ao uso das 3 vacinas atualmente no mercado especificam que o seu uso deve restringir-se apenas aos animais que sejam seronegativos nos testes serológicos (Toepp et al., 2018).

Nos últimos anos, no Brasil, foram licenciadas duas vacinas para administração nos cães. Ambas têm um protocolo primário que consiste em 3 injeções subcutâneas, separadas por 21 dias, com subsequentes reforços anuais (Martin et al., 2014; Reguera et al., 2016; Beugnet et al., 2018; Cotrina et al., 2018), fornecendo desse modo, uma proteção de 12 meses (Miró & López-Vélez, 2018).

1.14.3.1) Leishmune®

A Leishmune® (Zoetis, Brasil) é uma vacina de segunda geração e o antígeno é um Fucose-Mannose Ligand (FML), uma fração da glicoproteína GP36, obtida a partir de *Leishmania donovani*. A vacina tem como adjuvante uma saponina (QuilA) (Reguera et al., 2016; Lopes et al., 2018). A Leishmune® foi licenciada no Brasil em 2003 para proteger os cães contra *L. donovani*. A sua manufatura e comercialização foram suspensas temporariamente em 2014 por não cumprir os requerimentos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brasil) relativos a eficácia vacinal em ensaios clínicos de fase III, contudo, atualmente já se encontra novamente no mercado (Moreira et al., 2016; Lopes et al., 2018).

Em ensaios clínicos mais precoces demonstrou induzir um efeito protetor significativo de longa duração contra a CanL. A sua atividade melhorava o estado clínico do animal e reduzia a carga parasitária nos animais infetados, pois contribuía para promover uma resposta imunitária do tipo Th1, com aumento das citocinas IFN- γ e IL-2 e ativação dos linfócitos CD8⁺ e dos macrófagos. Provocava também um aumento das imunoglobulinas IgG, as quais se mantinham estáveis durante um longo período de tempo (Borja-Cabrera et al., 2004; Hosein et al., 2016; Reguera et al., 2016).

Os cães vacinados não apresentavam sinais clínicos nem parasitas em amostras de pele, linfonodos e sangue (Nogueira et al., 2005; Vulpiani et al., 2011), o que indica que estes animais não eram infecciosos. Assim a Leishmune® podia contribuir para a redução da prevalência e incidência da doença nas populações de cães e seres humanos em zonas endêmicas, uma vez que reduzia o risco de transmissão da doença para os flebótomos (Palatnik-de-Sousa et al., 2009; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Reguera et al., 2016).

A sua eficácia contra a doença e a morte após a infeção em testes de campo foi de 76%, com uma taxa de proteção da população de 92% (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Gharbi et al., 2015; Lopes et al., 2018).

Foi indicada para ser usada também como imunoterapia para cães já infetados (Hosein et al., 2016).

A administração subcutânea da vacina era bem tolerada nos cães, contudo foram relatados efeitos adversos leves e transitórios no local da injeção, como dor, edema e reações cutâneas. Raramente anorexia, vômitos, diarreia e granulomas pós-vacinação (Parra et al., 2007; Reguera et al., 2016).

1.14.3.2) Leish-Tec®

A Leish-Tec® (Hertape Calier Saúde Animal SA, Brasil) é composta por um antigénio recombinante, a proteína A2, obtida a partir da forma amastigota do parasita e usa uma saponina como adjuvante (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Gharbi et al., 2015; Reguera et al., 2016; Lopes et al., 2018). Foi a primeira vacina recombinante aprovada no Brasil, em 2013 (Reguera et al., 2016; Coura-Vital et al., 2018).

Este antigénio induz uma resposta imunitária protetora contra a doença (Lopes et al., 2018) pois as células infetadas vão apresentar epítomos específicos, moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) que são distintas das moléculas características presentes na superfície das células do indivíduo infetado, o que vai levar a ativação do sistema imunitário e consequentemente dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Fernandes et al., 2012).

A Leish-Tec® previne o desenvolvimento da CanL e atrasa o aparecimento dos sinais clínicos, como foi mostrado num ensaio experimental realizado em cães da raça Beagle, *naïve*, onde a grande maioria dos animais vacinados permaneceu até ao final do estudo, sem sinais clínicos e com testes serológicos com resultados negativos (Fernandes et al., 2008).

É uma vacina que teve uma eficácia de 71,4% com base em resultados parasitológicos obtidos num estudo efetuado numa zona endémica do Brasil. Leva a um aumento dos anticorpos do tipo IgG e dos níveis de IFN- γ e simultaneamente a uma diminuição dos níveis da citocina

IL-10. Os níveis de IgG detetados por ELISA atingem o máximo um mês após a administração e os níveis de imunoglobulinas são inferiores aos observados após a administração da Leishmune® (Fernandes et al., 2014; Reguera et al., 2016).

O estudo comparativo desenvolvido por Fernandes et al. (2014) entre animais vacinados com Leishmune® e Leish-Tec®, demonstrou que não existia uma diferença significativa na carga parasitária presente nos animais vacinados com ambas as vacinas, assim como nas taxas de seropositividade, e na presença e intensidade dos sinais clínicos, contudo estes valores eram inferiores aos observados no grupo de controlo. As taxas de transmissão dos cães para os flebótomos em testes de xenodiagnóstico eram igualmente baixas.

Uma vantagem da Leish-Tec® é que os animais vacinados podem ser diferenciados dos cães que foram infetados naturalmente, uma vez que, esta vacina não interfere com os testes de diagnóstico, que usam antígenos de promastigotas (Fernandes et al., 2008).

Têm sido relatados diversos efeitos secundários após a administração da vacina, como apatia, dor, claudicação, anorexia, edema e inflamação nos linfonodos, maioritariamente devido ao adjuvante, sendo que estes efeitos são mais frequentes e intensos que os relatados com o uso de Leishmune® (Fernandes et al., 2014).

1.14.3.3) CaniLeish®

A CaniLeish® (LiESP/QA-21) (Virbac, Animal Health, França) foi a primeira vacina a ser licenciada na Europa, em 2011. É composta por proteínas excretadas-secretadas obtidas em cultura, da forma promastigota de *L. infantum* (LiESP) suplementada com o adjuvante (QA-21), que é uma fração purificada da saponina *Quillaja saponaria* (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Brianti et al., 2016; Hosein et al., 2016; Reguera et al., 2016; Cotrina et al., 2018).

O protocolo de administração consiste em 3 injeções subcutâneas com um intervalo de 21 dias, seguidas de reforços anuais (Bourdeau et al., 2014; Martin et al., 2014; Oliva et al., 2014; Brianti et al., 2016; Cotrina et al., 2018).

Tal como as restantes vacinas, reduz o risco de desenvolver uma infeção ativa e sinais clínicos após o contato com o parasita (Starita, Gavazza, & Lubas, 2016).

O estudo levado a cabo por Moreno et al. (2014) confirmou que a CaniLeish® estimula uma resposta imunitária do tipo Th1, sendo que após a primovacinação os níveis sanguíneos do anticorpo IgG e da citocina IFN- γ permaneceram constantes durante aproximadamente 1 ano.

Igualmente, o estudo desenvolvido por Martin et al. (2014), onde cães da raça Beagle, *naïve*, foram vacinados com CaniLeish® e 1 ano depois inoculados com *L. infantum*, confirmou que

após este período e sem receberem o reforço anual, os cães que tinham sido vacinados continuavam a estar mais aptos para controlar o parasita. O perfil imunológico evidenciado por estes animais, medido *in vitro*, permaneceu superior nos animais vacinados. Estes rapidamente desenvolveram uma resposta do tipo Th1 em conjunto com uma regressão na progressão para doença clínica, em cerca de 66,6% dos casos. Estes resultados foram baseados na carga parasitária presente, que de acordo com os resultados obtidos por PCR de amostras de medula óssea, estava significativamente reduzida.

Foram obtidos resultados similares no estudo realizado por Oliva et al. (2014) que pretendia avaliar a capacidade da vacina em reduzir a incidência de infeções ativas, quando expostos naturalmente ao parasita em zonas hiperendémicas. Após 2 anos de seguimento a taxa de redução da incidência de infeções ativas nos cães vacinados foi cerca de 68%, pois no caso do grupo de controlo cerca de 32% dos animais apresentavam uma infeção ativa. Adicionalmente, relativamente aos animais infetados, apenas 7,3% dos animais vacinados apresentavam sinais clínicos, contra 23,1% dos cães do grupo de controlo, o que mostra que a vacina reduziu significativamente a probabilidade de os animais desenvolverem sinais clínicos.

A vacina mostrou ser segura e bem tolerada pelos cães, contudo foram descritas reações locais moderadas e transitórias, como edema, dor à palpação, eritema e formação de nódulos no local de injeção. Estas reações regrediram espontaneamente durante um período de 2 dias a 8 dias (Oliva et al., 2014).

Relativamente a esta vacina já foram observados outros sinais temporários como hipertermia, apatia e alterações digestivas após a vacinação (Reguera et al., 2016).

O estudo desenvolvido por Solano-Gallego et al. (2014) relatou que o uso do teste serológico de triagem, Speed Leish K®, antes da administração da CaniLeish® pode não ser apropriado uma vez que a sua sensibilidade era substancialmente mais reduzida que a verificada com os testes de ELISA e IFAT, o que pode levar à vacinação de cães seropositivos e em alguns casos, de cães doentes.

Por fim, o inquérito realizado por Lladró et al. (2016) demonstrou que nas clínicas e hospitais onde foi realizado o estudo, a CaniLeish® era o segundo método preventivo mais utilizado e que 82% dos médicos veterinários relataram a ocorrência de efeitos secundários nos animais vacinados, sendo que os mais frequentes foram reações no local da injeção (como inflamação, dor e feridas) e apatia, correspondendo respetivamente a cerca de 33% e 27% dos relatos. Reações graves, como síncope, febre e sinais gastrointestinais, ocorreram com uma incidência mais reduzida. Também existem relatos de casos de choque anafilático e de morte, contudo a sua incidência foi muito reduzida.

1.14.3.4) Letifend®

Diversos estudos têm provado que a resposta imunitária contra antígenos internos do parasita pode ter um papel importante no controlo da doença (Cotrina et al., 2018). Como exemplo, os determinantes antigénicos obtidos da histona H2A de *L. infantum* foram reconhecidos no soro de cães com CanL sintomática (Soto et al., 1995), pelo que o soro destes cães foi usado para identificar 4 proteínas de *L. infantum* com um elevado potencial antigénico: as proteínas ribossomais LiP2A, LiP2B, LiP0 e a histona H2A (Cotrina et al., 2018), que com base em diversos estudos realizados em ratos e cães mostraram ser seguras, eficazes e altamente imunogénicas contra o desenvolvimento da doença (Iborra et al., 2008; Soto et al., 2015; Cotrina et al., 2018). Assim, surgiu a proteína recombinante quimérica, Proteína Q, formada por epítomos derivados das 3 proteínas ribossomais mencionadas, assim como da histona H2A (Cotrina et al., 2018).

Deste modo, em 2017, a vacina Letifend® (Laboratorios LETI, Espanha) ficou disponível para uso na Europa. O seu ingrediente ativo é a proteína Q e está indicada para a imunização de cães não infetados a partir dos 6 meses de idade, para reduzir o risco de estes desenvolverem uma infeção ativa e/ou sinais clínicos após contacto com o parasita. É necessário administrar a vacina apenas uma vez por ano. Esta vacina não possui adjuvante (Cotrina et al., 2018), anteriormente o adjuvante utilizado, BCG, era responsável por desencadear um grande número de efeitos secundários como dor, abscessos, irritação da pele e inclusive casos de hipersensibilidade (Reguera et al., 2016).

No estudo desenvolvido por Cotrina et al. (2018) foi avaliada a eficácia e segurança da vacina Letifend® contra a CanL em condições naturais, mais especificamente em zonas endémicas do Sul da Europa (Espanha e França).

Os efeitos secundários provocados pela vacina, que foram avaliados através de exames físicos, realizados em diversas fases do estudo, incluíram: presença de edema, dor, inflamação e endurecimento no local de injeção. Foi feita uma avaliação da tolerância à vacina através da observação do estado geral do animal, foram avaliados tecidos e órgãos, como os olhos, ouvidos, linfonodos e membranas mucosas, assim como, o funcionamento dos vários sistemas do organismo como o sistema circulatório, respiratório e nervoso. Para além disso foi medida a temperatura rectal em cada avaliação.

Foi também avaliada a resposta imunitária humoral à vacina em diversas fases do estudo, para determinar o título de anticorpos IgG desenvolvidos contra a proteína Q, através dos testes ELISA e IFAT. Para deteção do parasita os animais foram avaliados através de testes

parasitológicos e com o “real-time” PCR, foi avaliada a prevalência da doença no final do estudo.

Este estudo demonstrou a eficácia e segurança desta vacina na prevenção da leishmaniose canina. A proteína Q provou ser segura numa grande diversidade de raças, idades e pesos, uma vez que, nenhum animal vacinado apresentou uma reação adversa local ou sinais clínicos sistémicos. Os autores especularam que a sua segurança pode dever-se ao facto de a vacina ser de uma dose única anual e de não conter adjuvantes externos ao contrário das outras vacinas. A administração da vacina também foi vigiada em cães seropositivos ao longo de um ano, mostrando que se trata de uma vacina segura nestes animais, uma vez que não piorou o desenvolvimento da doença. Para além disso também demonstrou ser capaz de desencadear uma resposta imune adequada, já que se verificou um aumento consistente dos anticorpos IgG nos animais vacinados, atingindo o valor máximo 14 a 28 dias após à primeira dose da vacina e novamente após 365 dias com o reforço anual (Cotrina et al., 2018).

Relativamente à prevalência da CanL, no final do estudo, 10,2% dos animais do grupo de controlo tinham desenvolvido a doença, contra apenas 4,7% dos animais vacinados. Os sinais clínicos evidenciados pelos animais também foram mais graves e numerosos no grupo de controlo, pois 32,8% destes animais apresentavam sinais clínicos. Comparativamente, no grupo dos animais vacinados apenas 12,9% os manifestaram, o que demonstrou que a Letifend® ajuda a reduzir a incidência e a gravidade dos sinais clínicos relacionados com a CanL. Adicionalmente, dos 19 canis onde foram analisados os animais incluídos neste estudo, os 2 canis com a maior incidência de leishmaniose canina foram escolhidos para avaliar a eficácia da vacina, pois representavam uma zona altamente endémica da doença. A análise mostrou que 34% dos animais do grupo de controlo estavam infetados, contra apenas 9,5% de casos clínicos no grupo dos animais vacinados. Deste modo, a vacina foi avaliada como tendo uma eficácia de 72% na prevenção de casos clínicos de leishmaniose canina em zonas endémicas. Também foi verificado que a vacinação com Letifend® não interferia com os testes serológicos de diagnóstico (Cotrina et al., 2018).

1.14.4) Aplicação em estratégias de controlo

Visto que, nenhuma das vacinas atuais é capaz de proteger completamente o animal contra a infeção com *Leishmania infantum*, o seu uso deve fazer parte de um programa de controlo integrado contra a CanL. A vacinação associada ao uso de inseticidas tópicos é sem dúvida o método mais eficaz de controlo e prevenção da doença (Brianti et al., 2016; Miró & López-Vélez, 2018; Ribeiro et al., 2018).

Apesar de, as vacinas disponíveis não prevenirem a 100% o estabelecimento da infeção, o seu uso pode contribuir para diminuir as cargas parasitárias no organismo dos cães suscetíveis, o que por sua vez, diminui a transmissão do parasita para o inseto vetor, o que eventualmente pode ajudar a limitar a transmissão do parasita entre os cães e para o ser humano. O uso em larga escala de vacinas em zonas endémicas pode, contudo, ser problemático, devido aos métodos convencionais de diagnóstico serem incapazes de discriminar entre os anticorpos induzidos pela vacinação e os produzidos para combater a infeção natural. O desenvolvimento de vacinas que permitam esta distinção deve ser encorajado (Paltrinieri et al., 2016; Dantas-Torres et al., 2018), assim como o uso de outros métodos de diagnóstico para além dos testes serológicos quantitativos que são os mais frequentemente usados. Toda a informação disponível, incluindo a história vacinal, sinais clínicos, resultados de exames hematológicos e bioquímicos e o uso de testes específicos como citologia e PCR, devem ser combinados para se proceder a uma distinção acertada (Solano-Gallego et al., 2017).

1.14.5) Perspetivas futuras

As vacinas mencionadas são de segunda geração, contudo estão em desenvolvimento novos modelos, como as vacinas de DNA de terceira geração (Palatnik-de-Sousa, 2012). Estas vacinas necessitam de um vetor para replicar os genes e para expressar os antígenos codificados no interior dos mesmos (Alcolea, Alonso & Larraga, 2018). O seu uso é seguro, contudo possuem um risco inerente, que se deve a potenciais reações imunitárias contra o plasmídeo ou a sua integração no genoma do animal. Para além disso, existe a preocupação de se tratar de um organismo geneticamente modificado (GMO) com um potencial impacto negativo no ambiente (Reguera et al., 2016).

Também em desenvolvimento estão as vacinas com base em péptidos. Estes apresentam diversas vantagens como antígenos, incluindo maior estabilidade, reduzida complexidade e custos de manufatura. Contudo são pouco imunogénicos e necessitam de ser combinados com outros elementos, como adjuvantes altamente imunogénicos. Recentemente, avanços no desenvolvimento destas vacinas, com a criação de vacinas polipeptídicas ou quiméricas,

mostraram-se eficazes na indução de uma resposta imunitária altamente específica (De Brito et al., 2018).

Nos estudos de Dias et al. (2017) concluiu-se que o uso destas proteínas tem potencial no diagnóstico da leishmaniose em cães e seres humanos, tal como podem ter um papel protetor quando usadas como vacina.

Ainda assim, a criação de vacinas eficazes e universais ainda tem de enfrentar numerosas limitações, tais como a enorme diversidade genética dos parasitas pertencentes ao género *Leishmania* e a incapacidade de desenvolver em laboratório situações de infeção que sejam semelhantes às observadas no meio natural. Adicionalmente, as investigações são dificultadas devido ao desenvolvimento crónico da CanL e à natureza polimórfica da infeção, com os seus variados padrões de resistência e suscetibilidade. Isto implica elevados custos para a realização das investigações. É necessário um grande número de cães, assim como um longo período de tempo para que se possam obter conclusões acertadas acerca da eficácia clínica de uma vacina. Ambos estes aspetos estão em desacordo com o bem-estar animal, particularmente por ser necessário realizar avaliações periódicas que requerem o uso de técnicas invasivas como biópsias. Posto isto, torna-se difícil o estabelecimento de estudos de longa duração (Gradoni, 2015).

Capítulo 3 - Estudo retrospectivo sobre os efeitos secundários das vacinas Letifend® e CaniLeish®

1) Objetivos do estudo

Este estudo foi concebido com o objetivo de avaliar os efeitos secundários provocados pelo uso das vacinas CaniLeish® e Letifend®.

Mais especificamente:

- Avaliar quais os efeitos provocados pelo uso de cada vacina.
- Aferir a incidência destas reações adversas na população canina estudada.
- Caracterizar o grupo de animais afetados tendo em conta características como a idade, raça, sexo e peso, de modo a perceber se existe alguma relação entre estes parâmetros e uma maior suscetibilidade à ocorrência de efeitos adversos.
- Avaliar qual das duas vacinas será a mais bem tolerada pelos cães.
- Avaliar se os protocolos vacinais usados nos animais seguiam as normas estipuladas, em particular se antes da administração da vacina era efetuado algum teste de diagnóstico para detetar a presença do parasita.
- Avaliar se a vacina CaniLeish®, sendo mais antiga, continua a ser usada e o quão frequentemente foi substituída pela Letifend® e se os motivos para tal estariam relacionados com a ocorrência de efeitos adversos.

2) Material e Métodos

2.1) Amostragem

Este estudo, foi realizado no Hospital Veterinário do Restelo, e foram avaliados retrospectivamente, um total de 157 animais da espécie *Canis lupus familiaris* (N=157), especificamente 73 cães (N=73) aos quais foi administrada CaniLeish® e 84 (N=84) nos quais foi usada a Letifend®.

Foi usado o programa informático *QVET* 9.7.186.64 do ano 2018, para a identificação dos cães e para a respetiva recolha de dados clínicos. Em ambos os grupos, a informação recolhida e registada de cada animal incluiu dados básicos como a raça, sexo, peso vivo e idade (ambos aquando da administração da primeira dose da vacina) e morte (quando disponível). Nos animais que foram imunizados com CaniLeish® registou-se, adicionalmente, para além dos dados básicos, as datas das primeiras 3 doses da vacina (primovacinação), a data do primeiro reforço anual da vacina (quando disponível) e se esta continuava a ser usada atualmente, em concreto se houve alguma revacinação no período de 2018-2019.

Para ambos os grupos e em todas as inoculações foram recolhidos todos os efeitos secundários descritos na ficha clínica do animal. Estes foram todos os sinais manifestados pelo animal após a toma da vacina e que através da análise da história clínica não pudessem ter origem noutro problema. Por fim, em ambos os grupos de animais foi registado se cada animal realizou um teste de diagnóstico antes de ser vacinado, que teste foi e qual o seu resultado.

2.1.1) Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra todos os animais que não possuíam as informações mínimas indispensáveis para a recolha de dados, como a idade, sexo e peso. Relativamente a raça esta podia ser indefinida.

No caso do grupo de animais vacinados com CaniLeish® foram também excluídos os animais que não apresentavam um protocolo de primovacinação completo.

2.2) Análise estatística

Após a recolha dos dados das fichas clínicas dos animais da amostra, procedeu-se à análise estatística descritiva dos mesmos através do programa informático *Microsoft® Office EXCEL* (*Office Professional Plus 2010*).

3) Resultados

3.1) Caracterização da amostra

3.1.1) CaniLeish®

Os animais da amostra (N=73) tinham idades compreendidas entre os 5 meses e os 13 anos, com (média (\bar{x}) = 3,2 e desvio padrão (σ) = 2,9 anos de idade), sendo 6 meses a moda da idade (Gráfico 2). Relativamente ao peso vivo dos animais, este parâmetro variou entre os 2,3 e os 49 quilogramas (kg) (média (\bar{x}) = 18,8 kg e desvio padrão (σ) = 12,4 kg) (Gráfico 3).

Gráfico 2: Distribuição por idades dos cães vacinados com CaniLeish®.

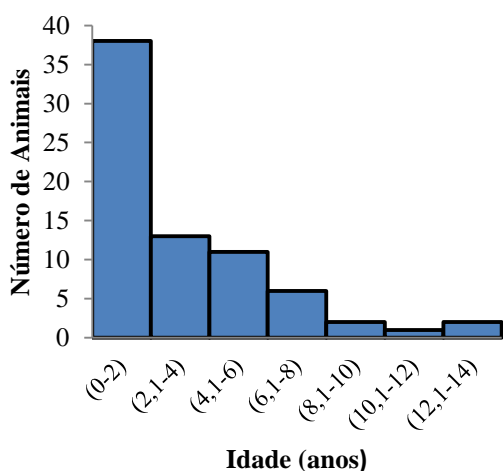
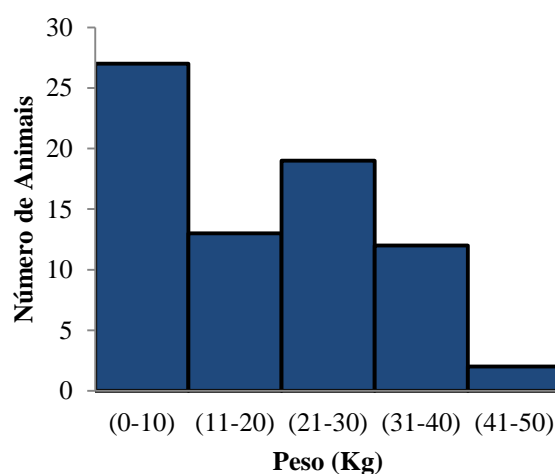


Gráfico 3: Distribuição por pesos dos cães vacinados com CaniLeish®.



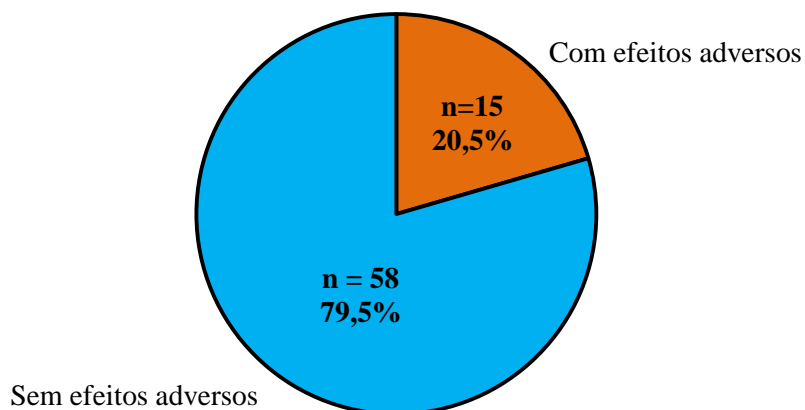
Relativamente à raça, por ordem decrescente, participaram no estudo animais de raça indefinida (21/73) e 28 raças, incluindo o Yorkshire Terrier (8/73), Caniche (4/73), Golden Retriever (4/73), Boxer (3/73), Beagle (3/73), Cocker Spaniel (3/73), Lulu da Pomerânia (2/73), Dálmata (2/73), Bichon Maltês (2/73), Labrador Retriever (2/73), Cavalier King Charles Spaniel (2/73), Pug (1/73), Springer Spaniel (1/73), Rottweiler (1/73), West Highland White Terrier (1/73), Collie (1/73), Épagneul Breton (1/73), Pinscher Miniatura (1/73), Bullmastif (1/73), Bulldog Inglês (1/73), Galgo (1/73), Fox Terrier (1/73), Schnauzer Anão (1/73), Pastor Shetland (1/73), Pastor Suíço (1/73), Leão da Rodésia (1/73), Pastor Alemão (1/73) e Cão de Água Português (1/73).

Em relação ao sexo, 60,3% (44/73) dos animais eram machos e 39,7% (29/73) eram fêmeas.

3.1.1.1) Incidência e caracterização dos efeitos secundários

Dos 73 animais que foram imunizados com CaniLeish®, 15 desenvolveram efeitos secundários devido à vacinação (15/73), o que corresponde a uma incidência de 20,5% na população canina estudada.

Gráfico 4: Distribuição da incidência de efeitos secundários.



Na tabela 1 estão descritos os dados básicos dos animais que apresentaram efeitos secundários, incluindo raça, idade, sexo e peso vivo e é indicado em que inoculação surgiram os efeitos secundários apresentados. Também está descrito o protocolo vacinal realizado por cada animal, que inclui sempre a primovacinação na sua totalidade. Quando disponíveis, o primeiro reforço anual e a existência de um reforço mais recente também estão descritos, na sua ausência é indicado o motivo.

Por fim é descrito o tratamento aplicado em cada caso.

Tabela 1: Caracterização dos animais que tiveram efeitos adversos, incluindo o protocolo vacinal, descrição dos efeitos secundários e tratamento aplicado.

Caracterização do Animal	Protocolo vacinal	Efeitos secundários	Tratamento
Yorkshire Terrier 2 anos, Macho, 4Kg	1ª dose 7/7/11 Teste rápido (TR) (-) 2ª dose 28/7/11 3ª dose 18/8/11 Reforço anual (RA) 17/8/12 Vacina Atual (VA) 9/8/18	Ocorreram na 2ª dose: 28/7/11: Nódulo, reação de inflamação local com edema	Betametasona (Betnovate®) BID ou TID, 4 dias; Gelo BID, TID; Ácido tolfenâmico (Tolfedine®) SID, 4 dias
Lulu da Pomerânia, 7 meses, M, 4 Kg	1ª dose 11/9/12 TR (-) 2ª dose 10/10/12 3ª dose 10/11/12 RA 20/11/13 VA 29/10/18	Ocorreram na 1ª dose: 11/9/12: Vômitos, dor no local de inoculação, prostração e hipersíalía durante 3 dias	
West Highland White Terrier, 4 anos, M, 8,1 kg	1ª dose 19/9/11 TR (-) 2ª dose 11/10/11 3ª dose 31/10/11 RA 28/9/12 Descontinuou a vacina (DV)	Ocorreram na 1ª dose: 19/9/11: Tremores, febre (39.6°C) e hipersíalía	Ficou sob vigilância 2h
Yorkshire Terrier, 5 anos, M, 2,9 kg	1ª dose 14/7/11 Não fez teste rápido (NFTR) 2ª dose 8/8/11 3ª dose 30/8/11 RA 9/10/12 DV	Ocorreram na 3ª dose: 30/8/11: Tremores e febre	Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®)
Pinscher Miniatura, 3 anos, M, 2,3 kg	1ª dose 7/9/11 TR (-) 2ª dose 30/9/11 3ª dose 19/10/11 RA 23/10/12 Trocou para a Letifend (L)	Ocorreram na 3ª dose: 19/10/11: Prostração e febre	
Caniche, 10 anos, Fêmea, 7kg	1ª dose 6/10/11 TR (-) 2ª dose 29/10/11 3ª dose 19/11/11 RA 24/11/12 Morreu (M)	Ocorreram na 2ª dose: 29/10/11: Dor no local de inoculação e prostração	Carprofeno (Rymadyl®)
Yorkshire Terrier, 5 anos e 7 meses, M, 2kg	1ª dose 27/9/11 TR (-) 2ª dose 19/10/11 3ª dose 12/11/11 RA 6/12/12 L	Ocorreram em todas as administrações: Prostração, dor no local de inoculação, edema local, febre e vômitos	Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®)
Pastor Shetland, 7 meses, M, 14kg	1ª dose 27/12/12 TR (-) 2ª dose 16/1/13 3ª dose 4/2/13 RA 5/3/14 DV	Ocorreram na 1ª dose: 27/12/12: Vômitos	

Tabela 1: Caracterização dos animais que tiveram efeitos adversos, incluindo o protocolo vacinal, descrição dos efeitos secundários e tratamento aplicado (cont.).

Raça indefinida, 6 meses, M, 30 kg	1ª dose 29/12/12 TR (-) 2ª dose 19/1/13 3ª dose 9/2/13 DV	Ocorreram na 2ª dose: 19/1/13: Angioedema	Metilprenisolona (Solumedrol IV®)
Raça indefinida, 2 anos e 9 meses, F, 27,5kg	1ª dose 12/1/13 TR (-) 2ª dose 9/2/13 3ª dose 2/3/13 9/3/13- Repetiu a 3ª dose DV	Ocorreram na 3ª dose: 2/3/13: Angioedema	Metilprednisolona (Solumedrol IV®)
Yorkshire Terrier, 13 anos, F, 3kg	1ª dose 25/1/13 TR (-) 2ª dose 14/2/13 3ª dose 8/3/13 RA 24/4/14 M	Ocorreram na 1ª dose: 25/1/13: Prostração	
Yorkshire Terrier, 2 anos, M, 3.8kg	1ª dose 7/7/11 TR (-) 2ª dose 28/7/11 3ª dose 18/8/11 RA 17/8/12 VA 9/8/18	Ocorreram na 1ª e 2ª doses: 7/7/11 e 28/7/11: Nódulo, reação de inflamação local com edema	Betametasona (Betnovane®) BID ou TID 4 dias; Gelo BID, TID; Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®) SID, 4 dias
Caniche Toy, 6 meses, F, 3,5 kg	1ª dose 30/3/12 TR (-) 2ª dose 20/4/12 3ª dose 11/5/12 RA 10/5/13 VA 26/1/19	Ocorreram na 1ª dose: 30/3/12: Dor no local de inoculação e prostração	Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®)
Raça indefinida, 1 ano e 3 meses, F, 10kg	1ª dose 14/1/14 TR (-) 2ª dose 4/2/14 3ª dose 26/2/14 RA 26/2/15 L	Ocorreram na 1ª e 2ª doses: 14/1/14 e 4/2/14: Dor no local de inoculação, prostração e febre	Meloxicam (Metacam®) 1mg à noite
Beagle, 6 meses, F, 9 kg	1ª dose 20/1/14 TR (-) 2ª dose 10/2/14 3ª dose 19/3/14 RA 13/4/15 L	Ocorreram na 1ª e 2ª doses: 20/1/14 e 10/2/14: Dor no local de inoculação e angioedema	Metilprednisolona (Solumedrol IV®), teve alta após 1h

Nos gráficos que se seguem procede-se à distribuição da incidência dos efeitos secundários por raça, sexo, idade e peso (Gráficos 5 a 8).

Gráfico 5: Distribuição dos efeitos secundários por raça.

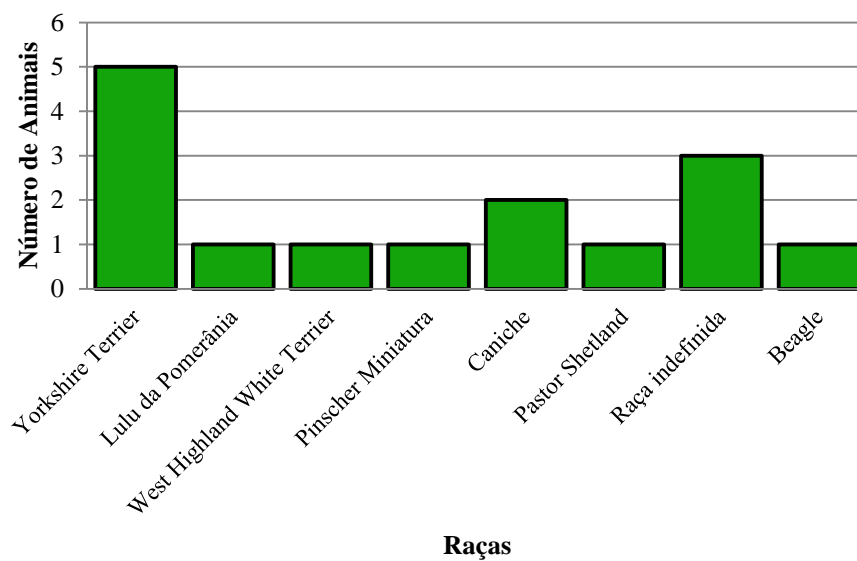


Gráfico 6: Distribuição dos efeitos secundários por sexo.

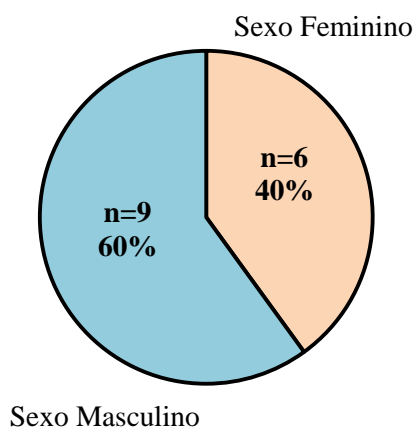


Gráfico 7: Distribuição dos efeitos secundários por idade.

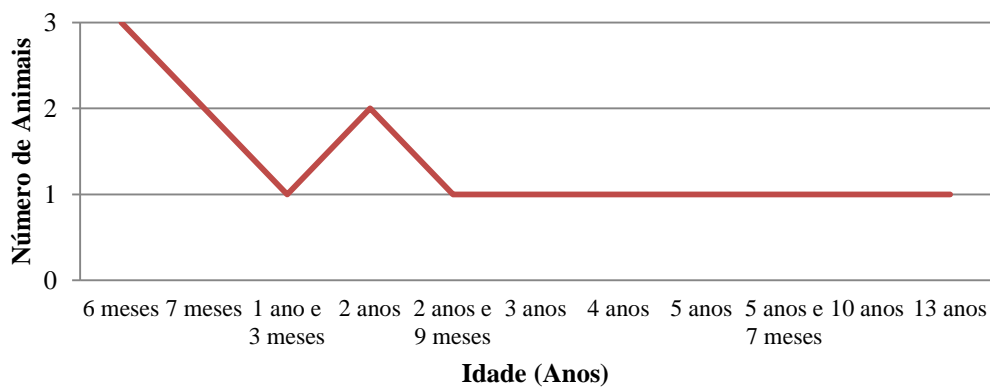
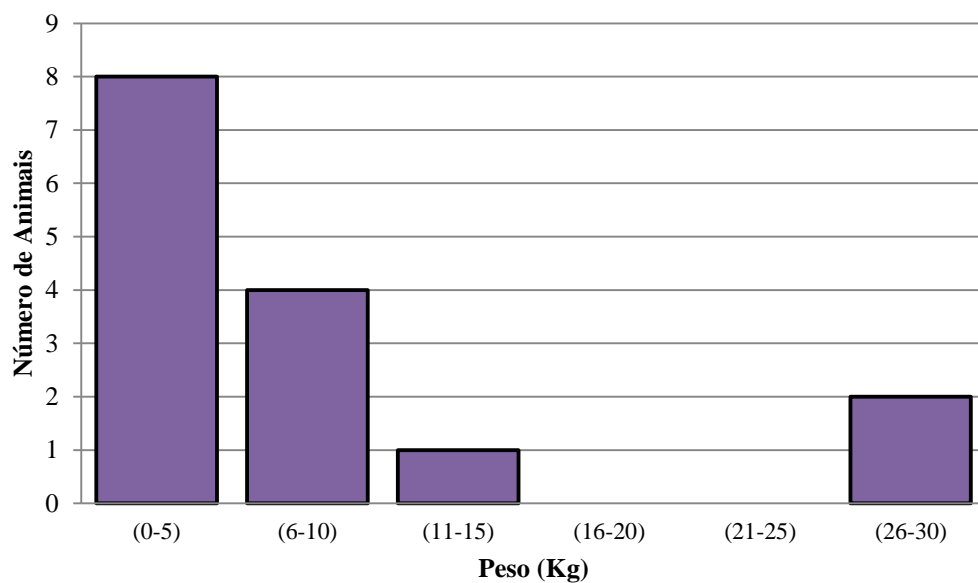
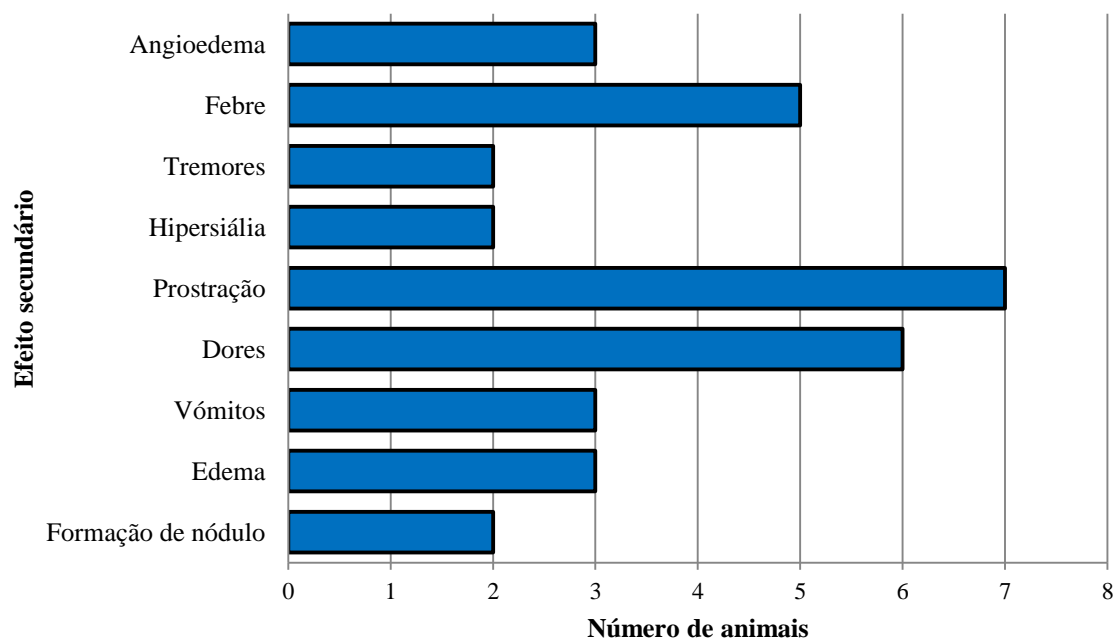


Gráfico 8: Distribuição dos efeitos secundários por peso.



Como se pode verificar na Tabela 1, a maioria dos animais apresentava mais do que um efeito secundário simultaneamente, sendo que no gráfico 9 foi avaliada a frequência de cada um individualmente.

Gráfico 9: Distribuição da incidência do tipo de efeito secundário.



Também com recurso à Tabela 1 é possível avaliar em que inoculação do protocolo de vacinação os cães manifestaram efeitos adversos, o que se encontra discriminado na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos animais por inoculação em que surgiram os efeitos secundários.

Episódio	FA	FR (%) N= 15
1ª Dose	5	33,3
2ª Dose	3	20
3ª Dose	3	20
1ª e 2ª Dose	3	20
Reforço anual (RF)	0	0
Todas as inoculações	1	6,7

3.1.1.2) Análise do protocolo vacinal

Do total de animais que foram imunizados com CaniLeish® (N=73), 34 animais (34/73) continuaram a usar a vacina, tendo levado reforços em 2018/2019, o que corresponde a 46,6%.

Dos restantes (39/73; 53,4%), 23 animais descontinuaram a vacina (23/73; 31,5%), 8 (8/73; 10,95%) morreram e 8 trocaram para a Letifend® (8/73; 10,95%).

Relativamente ao grupo de animais que descontinuaram a vacina (23/73), 5 animais tinham manifestado anteriormente efeitos adversos (5/23; 21,7%), os restantes (18/23) deixaram de levar os reforços anuais ou não existe mais informação na ficha do animal.

Dos que trocaram para a Letifend® (8/73), 4 também tinham tido previamente reações adversas (4/8). Continuaram a usar a CaniLeish® por decisão dos tutores, 4 animais.

Assim, na Tabela 3 é descrito como evoluiu protocolo vacinal dos animais que apresentaram efeitos secundários à vacina CaniLeish®.

Tabela 3: Evolução do protocolo vacinal dos animais que tiveram efeitos adversos à vacina CaniLeish®.

	Nº	FR (%) N= 15
Descontinuaram a CaniLeish®	5	33,3
Morreram (causas não relacionadas com a vacina)	2	13,3
Trocaram para a Letifend®	4	26,7
Continuaram a usar CaniLeish®	4	26,7

Em relação à realização de um teste diagnóstico antes da inoculação com CaniLeish®, 66 animais (66/73) utilizaram o kit de teste rápido Speed Leish K® (Virbac) para diagnóstico serológico qualitativo, antes da administração da primeira dose da vacina, o que equivale a 90,4%, sendo que em todos eles o resultado do teste foi negativo.

Dos restantes (7/73; 9,6%), três animais (3/73; 4,10%) realizaram uma titulação de anticorpos em 2010, sendo que no caso destes cães a análise foi realizada num laboratório especializado, e um realizou o teste serológico Leiscan[®] Leishmania Elisa Test (1/73; 1,4%). Em todos estes animais estes testes foram realizados antes da primeira vacinação, sendo os resultados igualmente negativos.

Apenas dois cães não realizaram qualquer teste antes de serem vacinados (2/73; 2,7%) e um realizou o teste rápido Speed Leish K[®] apenas antes da 2^a dose da vacina, tendo o resultado sido negativo (1/73; 1,4%).

3.1.2) Letifend[®]

Os animais da amostra (N=84) tinham idades compreendidas entre os 5 meses e os 14 anos de idade com (média (\bar{x}) = 3,4 e desvio padrão (σ) = 3,5 anos de idade), sendo 8 meses a moda da idade (Gráfico 10). Relativamente ao peso vivo dos animais, este parâmetro variou entre os 2,5 e os 50 quilogramas (kg) (média (\bar{x}) = 21,5 kg e desvio padrão (σ) = 12 kg) (Gráfico 11).

Gráfico 10: Distribuição por idades dos cães vacinados com Letifend[®].

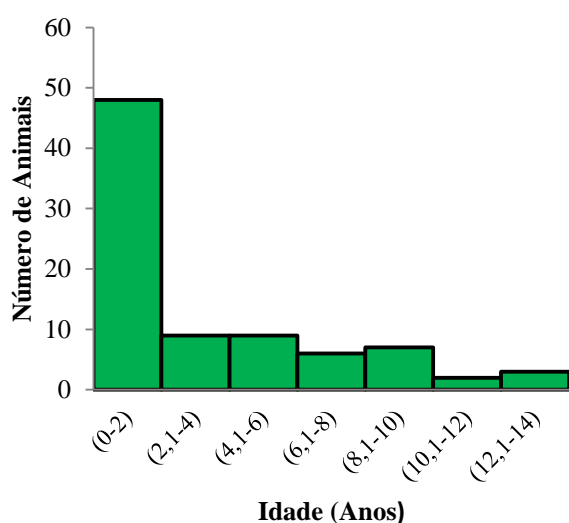
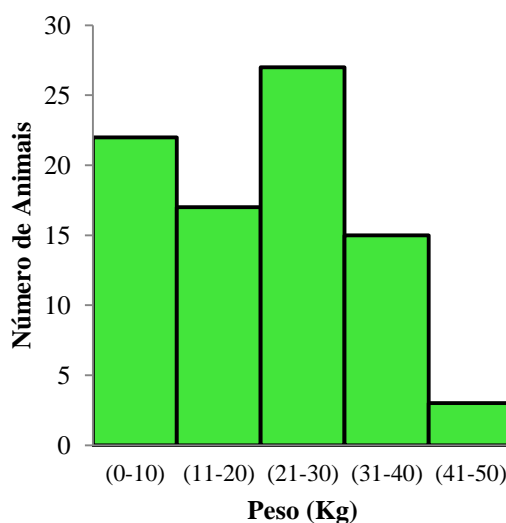


Gráfico 11: Distribuição por pesos dos cães vacinados com Letifend[®].



Relativamente à raça, por ordem decrescente, participaram no estudo animais de raça indefinida (22/84) e 34 raças, incluindo o Labrador Retriever (9/84), Golden Retriever (5/84), Bulldog Francês (4/84), Jack Russel Terrier (4/84), Boxer (2/84), Boston Terrier (2/84), Bull Terrier (2/84), Cão de água português (2/84), Grand Basset Griffon (2/84), Yorkshire Terrier (2/84), Rotweiller (2/84), Pug (2/84), Barbado da Terceira (1/84), American Straffordshire Terrier (1/84), Border Terrier (1/84), West Highland White Terrier (1/84), Whippet (1/84),

São Bernardo (1/84), Pinscher miniatura (1/84), Braco Alemão (1/84), Pitt Bull (1/84), Dogue Bordéus (1/84), Weimaraner (1/84), Galgo (1/84), Chihuahua (1/84), Serra de Aires(1/84), Cavalier King Charles Spaniel (1/84), Border Collie (1/84), Bulldog Inglês (1/84), Épagneul Breton (1/84), Beagle (1/84), Cane Corso (1/84) e Fila de São Miguel (1/84).

Em relação ao sexo, 57,1% dos animais eram machos (48/84) e 42,9% eram fêmeas (36/84).

3.1.2.1) Incidência e caracterização dos efeitos secundários

Considerando todos os animais (N=84), nenhum cão apresentou um efeito secundário à administração da vacina Letifend® (0/84; 0%).

3.1.2.2) Análise do protocolo vacinal

Todos os animais deste grupo foram imunizados apenas com Letifend®, sendo que 37 (37/84; 44%) levaram a primeira dose da vacina em 2017 e um reforço em 2018. No entanto, 13 cães (13/84; 15,5%) foram vacinados com a Letifend® em 2017, contudo não levaram o reforço em 2018, pelo que a vacina já não estava a proteger o animal. Os restantes 34 cães (34/84; 40,5%) foram vacinados pela primeira vez em 2018.

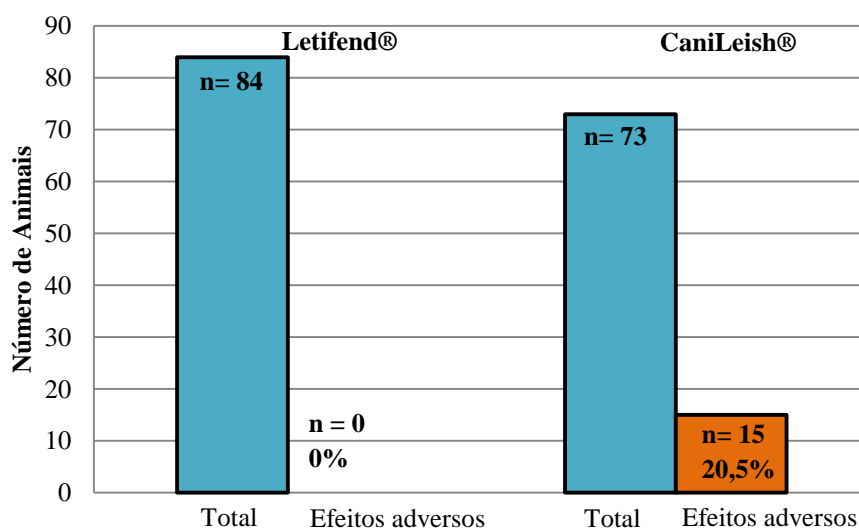
Em relação à realização de um teste diagnóstico antes do uso da Letifend®, 44 animais (44/84; 52,4%) utilizaram o kit de teste rápido Speed Leish K® para o diagnóstico serológico qualitativo, antes da administração da primeira dose da vacina, e em todos o resultado do teste foi negativo. Dos restantes, 30 cães (30/84; 35,7%) realizaram o teste Leiscan®, tendo o resultado sido igualmente negativo em todos os testes.

Por fim, apenas 10 cães (10/84; 11,9%). não realizaram qualquer teste diagnóstico antes da administração da vacina.

3.2) Comparação entre os efeitos secundários causados pelas vacinas CaniLeish® e Letifend®

Apenas a CaniLeish® provocou efeitos secundários em alguns animais da amostra, nenhum animal imunizado com Letifend® desenvolveu qualquer tipo de efeito adverso. A incidência de efeitos secundários que afetaram os animais inoculados com ambas as vacinas está discriminada no Gráfico 12.

Gráfico 12: Incidência de efeitos adversos provocados pelas vacinas CaniLeish® e Letifend® em comparação com o número total de animais de cada grupo.



4) Discussão

Este estudo pretendeu aferir retrospectivamente a presença de efeitos secundários em cães após vacinação contra a CanL, em especial relativamente as vacinas CaniLeish® e Letifend®, havendo apenas registo de reações adversas na utilização da primeira vacina.

Os cães vacinados com CaniLeish® neste estudo eram maioritariamente animais jovens, sendo que a maioria dos cães tinha até 2 anos de idade, facto que é suportado pela média de idades que foi obtida, cerca de 3 anos, assim como pela moda de idades que foi de 6 meses. A diversidade de pesos dos animais que foram imunizados com esta vacina é mais alargada, contudo, os cães com peso até aos 10 Kg foram os mais representados.

Para além da diversidade em termos de idade e sobretudo em termos de peso, este estudo incluiu uma variedade significativa de raças, 28 no total. Para além disso, o grupo de cães com mais expressão não tinha uma raça definida, o que aumentou ainda mais a diversidade da amostra em termos de parâmetros biológicos e morfológicos. Todavia a amostra estava bastante equilibrada em termos de sexos, sendo que havia ligeiramente mais machos do que fêmeas.

Tal como está descrito no artigo de Oliva et al. (2014) o uso da vacina CaniLeish® tem dado azo a diversos relatos que descrevem a ocorrência de efeitos secundários após a sua administração nos cães. As reações adversas descritas neste artigo incluíam edema, formação de nódulos, dor à palpação e eritema no local de injeção. Estes sinais estão descritos como sendo transitórios, regredindo espontaneamente num período compreendido entre 2 a 8 dias.

O artigo de Reguera et al. (2016) também menciona a ocorrência de outros sinais, igualmente temporários, mas mais gerais, como hipertermia, apatia/prostração e alterações digestivas.

Da mesma forma, o inquérito realizado por Lladro et al. (2016) demonstrou que o uso da vacina CaniLeish® provocou alguns efeitos secundários nos animais imunizados incluindo, os mais comuns, reações no local de injeção e apatia, mas também efeitos adversos mais graves como síncope, febre e inclusive sinais gastrointestinais, apesar de a incidência com que estes ocorreram ter sido mais reduzida.

Este artigo também revelou, através do inquérito realizado, que o valor de incidência destes efeitos secundários foi elevado na população de animais que recebeu a vacina, pois cerca de 82% dos médicos veterinários entrevistados relatou ter observado efeitos adversos nos animais.

Adicionalmente a bula da vacina CaniLeish® refere que após a injeção, podem ocorrer reações locais moderadas e passageiras como tumefação, nódulo, dor à palpação ou eritema, que desaparecem de forma espontânea em 2 a 15 dias. Em casos muito raros, referem a ocorrência de reações mais graves no local de injeção, como necrose no local de injeção e vasculite. Outros sinais comuns como hipertermia, apatia, e alterações digestivas, podem ser observados durante 1 a 6 dias após a vacinação. Por fim, refere que as reações alérgicas não são comuns e que caso ocorram, deve ser administrado o tratamento sintomático adequado (Virbac. CaniLeish®. Acedido em Mar. 29, 2020, disponível em: <https://pt.virbac.com/cao/produtos-cao/vacinas/canileish.html>).

No presente estudo, dos 73 animais aos quais foi administrada a vacina CaniLeish®, 15 apresentaram efeitos secundários à sua administração, o que corresponde a 20,5% dos animais imunizados. Apesar de não se tratar da maioria dos animais, continua a ser um valor expressivo e suporta os restantes estudos em que a CaniLeish® não foi considerada uma vacina inócua.

Os efeitos secundários descritos pelos médicos veterinários na ficha clínica dos animais afetados incluíam, por ordem decrescente de frequência: prostração, manifestação de dor, febre, edema e inflamação no local, vômitos, angioedema, formação de nódulo no local, hipersialia e tremores. Estes efeitos secundários estão de acordo com os descritos nos estudos mencionados (Oliva et al., 2014; Lladro et al., 2016; Reguera et al., 2016), sendo que, a grande maioria dos animais apresentava, simultaneamente, mais do que um efeito adverso. No geral, dor e prostração estavam presentes em mais de metade dos cães afetados. Alguns animais também apresentavam, simultaneamente, tremores e febre. A manifestação de reação local com sinais como formação de nódulo, edema e inflamação local também surgiu em alguns animais, assim como a ocorrência de angioedema, uma reação de hipersensibilidade do

tipo I que se caracteriza por ser uma reação imediata e aguda do sistema imunitário contra um antígeno invasor com o qual já teria tido contacto prévio. A hipersensibilidade ocorre apenas nas exposições subsequentes ao antígeno provocando um edema profundo na derme do animal, devido a exagerada resposta inflamatória criada pela enorme produção de IgE que leva a desgranulação de mastócitos com consequente libertação de histamina. Contudo, não se verificou nenhuma menção relativamente a efeitos mais graves como síncope.

Apesar da concordância entre este estudo, a bula da vacina os artigos supracitados no que diz respeito aos efeitos adversos observados, nenhum dos artigos mencionados realizou uma avaliação e caracterização da população canina afetada pelos mesmos.

Através da análise dos dados obtidos no presente estudo, verifica-se que a grande maioria dos cães afetados pertencia a raças de pequeno porte e consequentemente de peso reduzido, como o Yorkshire Terrier, Lulu da Pomerânia, West Highland White Terrier, Pinscher Miniatura, Caniche e Beagle, sendo que a raça mais frequentemente representada foi o Yorkshire Terrier, com 5 animais a serem afetados. Todos os animais das raças anteriormente referidas tinham um peso inferior a 10 kg, sendo que o peso dos cães da raça Yorkshire Terrier oscilava entre os 2 e os 4 kg. A predominância desta raça no grupo de animais com efeitos adversos pode dever-se à sua popularidade, comparativamente com cães de outras raças com um porte semelhante, o que levou a um aumento desproporcional da sua representação na amostra estudada (8/73).

Porém, nem todos os animais afetados eram de pequeno porte, um cão da raça Pastor de Shetland tinha um peso de 14 kg, um cão de raça indefinida tinha 10 kg e outros dois, igualmente sem raça definida, eram de grande porte, um com 27,5 kg e o outro com 30kg.

Deste modo, aparentemente, parece existir uma relação entre o peso e consequentemente a raça dos animais e a sua suscetibilidade aos efeitos adversos provocados por esta vacina. A maior incidência de efeitos nos cães de pequeno porte pode dever-se ao facto da CaniLeish® ser uma vacina com uma dose total padrão, tal como todas as outras vacinas (Moreno et al., 2012, 2014; Martin et al., 2014), pelo que não é possível ajustar a quantidade que é dada consoante o peso.

Todavia, o facto de também ter afetado cães de grande porte, indica que provavelmente o sistema imunitário de cada animal e a sua sensibilidade aos componentes da vacina é o fator preponderante. O sucesso da vacinação depende da capacidade do antígeno (LiESP) presente na vacina induzir, no organismo, uma resposta imunitária mediada principalmente por linfócitos T auxiliares do tipo Th1 (Gradoni., 2015), sendo que, o adjuvante contido na vacina desempenha um papel importante, uma vez que, auxilia no reconhecimento do antígeno pelo sistema imunitário (Miró et al., 2008). Contudo, os adjuvantes são considerados os principais

responsáveis pela ocorrência de efeitos secundários após a administração da vacina (Reguera et al., 2016), pelo que, provavelmente os animais que desenvolveram reações, independentemente do peso, foram aqueles cujo sistema imunitário foi mais sensível e reativo ao adjuvante utilizado, no caso da CaniLeish® o adjuvante (QA-21), uma fração purificada da saponina *Quillaja saponaria* (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Brianti et al., 2016; Hosein et al., 2016; Reguera et al., 2016).

Outros fatores, como o sexo e a idade não aparentam estar relacionados com uma maior propensão para o desenvolvimento destas reações adversas, visto que, os animais afetados eram de ambos os sexos, com uma distribuição bastante equilibrada, apenas com ligeiramente mais machos do que fêmeas, enquanto as idades dos cães da amostra variavam entre os 6 meses e os 13 anos, a maioria dos animais afetados eram jovens, com uma idade inferior a 3 anos, sendo que os animais com 6 e 7 meses representavam um terço da população afetada. Isto pode dever-se ao facto de o protocolo de vacinação ter início aos 6 meses de idade com as 3 injeções de primovacinação (Bourdeau et al., 2014; Martin et al., 2014; Beugnet et al., 2018), pelo que, se os animais seguirem um protocolo de vacinação correto vão contactar com a vacina pela primeira vez com esta idade.

A ocorrência dos efeitos adversos esteve presente nas 3 aplicações da vacina durante o protocolo de primovacinação. Maioritariamente ocorreram na primeira e segunda aplicação da vacina, sendo que, 5 animais tiveram efeitos adversos apenas na primeira aplicação, nomeadamente vómitos, dor no local de inoculação, prostração, hipersialia, tremores e febre. Três cães apenas durante a segunda aplicação com formação de nódulo e dores no local de inoculação, prostração e angioedema. Outros 3 cães durante as duas doses da vacina, com formação de nódulo e dores no local de inoculação, prostração, febre e angioedema. No total, o número de cães que apresentou reações adversas nas duas primeiras doses da vacina perfaz 11 animais, no total de 15. Apenas 3 animais tiveram efeitos somente na terceira aplicação, nomeadamente tremores, febre, prostração e angioedema. Só um teve reações secundárias em todas as aplicações, incluindo durante o primeiro reforço anual, com prostração, formação de nódulo e dores no local de inoculação, febre e vómitos.

Tal como foi descrito a ocorrência de angioedema apenas surge a partir da segunda dose da vacina, pois é necessário um contacto inicial com o antígeno para que a informação dos anticorpos IgE produzidos especificamente contra o antígeno seja guardada pelas células de memória.

Um dos tratamentos prescritos para debelar estas reações adversas foi o uso de Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®) SID durante 4 dias, em conjunto com a administração de Betametasona (Betnovate®), BID ou TID durante 4 dias, assim como a aplicação de gelo

várias vezes ao dia. Este tratamento foi prescrito em casos de formação de nódulos com inflamação e edema no local após a injeção. O Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®) também foi prescrito isoladamente em cães com febre, tremores, dor, prostração e vômitos. Carprofeno (Rymadyl®) foi prescrito no caso de um animal que ficou a claudicar e a Metilprednisolona (Solumedrol IV®) foi usada nos animais que desenvolveram angioedema. Três animais não apresentavam informações relativamente ao tratamento que realizaram.

A utilização destes fármacos é justificada, pois são medicamentos com substâncias ativas anti-inflamatórias, em particular o Ácido Tolfenâmico (Tolfedine®), e a Betametasona (Betnovate®). A Metilprednisolona (Solumedrol®) para além de ser um anti-inflamatório é também um medicamento imunossupressor e antialérgico, pelo que, o seu uso após a vacinação pode interferir com a ação da vacina. Por último, o Carprofeno (Rymadyl®) é um anti-inflamatório com uso particularmente frequente em casos de dor articular.

Ao analisar o total da população de cães que realizou o protocolo de primovacinação com a CaniLeish®, verifica-se que quase metade (34/73; 46,6%) continuava a usar a vacina em 2018/2019, sendo que nenhum desses cães manifestou qualquer efeito secundário como resultado da sua administração. Relativamente aos restantes animais, a maioria descontinuou a vacina. Alguns cães morreram, devido a causas não relacionadas com a vacina e outros trocaram para a Letifend®.

Dentro do grupo de animais que tiveram reações secundárias, 4 continuaram a usar a vacina por decisão dos tutores, 5 animais descontinuaram a vacina e 4 animais trocaram para a Letifend®, o que perfaz mais de metade dos animais afetados. Deste modo, estes cães apresentaram reações adversas suficientemente graves para levarem os tutores a desistirem de utilizar esta vacina. Assim, estes efeitos adversos podem ser um entrave sério à comercialização deste produto o que pode ter consequências graves, pois, apesar de o método atual mais importante para prevenir a CanL ser o uso de inseticidas tópicos, a vacinação é também método relevante na prevenção da doença e na transmissão de *L. infantum* entre a população canina e para o ser humano (Miró et al., 2008; Oliva et al., 2014; Moreira et al., 2016; Cotrina et al., 2018). Deste modo é importante que as vacinas sejam o mais seguras possível, para que o seu uso seja igualmente o mais alargado possível.

A grande maioria dos animais fez o teste rápido de diagnóstico Speed Leish K® antes da administração da primeira dose da CaniLeish®, sendo que em todos o teste foi negativo (66/73; 90,4%). Dos restantes, 3 realizaram uma medição do título de anticorpos com resultados igualmente negativos e 1 realizou o teste serológico Leiscan®. Apenas 2 animais não realizaram qualquer teste de diagnóstico e 1 realizou o teste antes da segunda dose da vacina, obtendo igualmente um resultado negativo.

Relativamente à Letifend®, trata-se de vacina que não possui adjuvante, considerado o principal responsável pelos efeitos secundários das vacinas, tal como está descrito nos artigos de Reguera et al. (2016) e Cotrina et al. (2018). A sua segurança foi avaliada no estudo de Cotrina et al. (2018) onde nenhum dos animais desenvolveu qualquer efeito secundário em resultado da administração das vacinas, sendo que os autores avançaram com a hipótese de que a ausência de efeitos nefastos pode dever-se em parte, precisamente à ausência do adjuvante, sendo a Letifend® a única vacina atualmente com esta particularidade.

Relativamente a bula da vacina, é descrito que após a vacinação, é observado com muita frequência que os cães coçam o local de injeção, com resolução espontânea no prazo de 4 horas. Foi também descrito raramente a ocorrência de letargia, vômitos, diarreia e hipertermia após a vacinação (ema.europa.eu. Letifend® Product information. Acedido em Mar. 29, 2020, disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/letifend-epar-product-information_pt.pdf).

No presente estudo, observou-se um resultado semelhante, uma vez que, em nenhum dos animais vacinados se registou a ocorrência de efeitos secundários e tratava-se de uma amostra de cães diversa em termos de idade, raça e peso e equilibrada em termos do sexo.

Também relativamente ao protocolo de vacinação com Letifend® a maioria dos animais realizou o teste serológico rápido qualitativo Speed Leish K® ou o teste serológico quantitativo Leiscan® através da titulação de anticorpos em laboratório, antes da administração da vacina (74/84; 88,1%), contudo, 10 animais não realizaram qualquer teste diagnóstico antes da vacinação (10/84; 11,9%). Visto que, para ambas as vacinas, nem todos os animais realizaram um teste diagnóstico antes da vacinação, não pode ser considerado que este procedimento esteja a ser aplicado tão corretamente como seria desejado no Hospital onde os dados foram recolhidos. Isto porque é essencial que nenhum animal seja vacinado sem antes ser confirmado que não está infetado, uma vez que ambas as vacinas indicam que uma das precauções especiais de utilização do produto é que este apenas seja usado em animais saudáveis e não infetados (Beugnet et al., 2018; Toepp et al., 2018).

Capítulo 4 – Conclusão

No presente estudo é notório que os resultados obtidos estão de acordo com os verificados em estudos semelhantes, concluindo-se que a CaniLeish® apesar de ser uma opção viável para o controlo e prevenção da leishmaniose canina, não é completamente inócua e segura, especialmente em cães de pequeno porte, pelo que os proprietários destes cães devem ser alertados para este facto e usar outros métodos de controlo. Principalmente os inseticidas tópicos, considerados atualmente o método preventivo principal e o mais eficaz no combate a esta doença. Como alternativa vacinal podem optar pela Letifend®, que mostrou ser segura em todos os animais em que foi aplicada, independentemente de fatores como o peso ou a raça.

As vacinas devem fazer parte de um plano de controlo integrado e como tal, todos os protocolos de prevenção devem combinar o uso de inseticidas tópicos com o uso de vacinas. Tendo em conta os resultados obtidos na população estudada poderá ser preferível optar por administrar a Letifend® a todos os animais, especialmente os jovens que estão a iniciar o seu protocolo vacinal e também aqueles que tendo já usado CaniLeish®, sejam especialmente suscetíveis aos seus efeitos.

Futuramente, será importante a realização de mais estudos que avaliem a segurança das vacinas atualmente em uso e em particular no caso da CaniLeish® deve ser feita uma avaliação das características dos animais afetados e do porquê da sua maior suscetibilidade/tendência para o desenvolvimento de efeitos secundários. Desse modo será possível minimizar a ocorrência de efeitos adversos ao limitar a exposição de certos animais potencialmente mais suscetíveis ao contacto com esta vacina.

Adicionalmente, devem ser desenvolvidas novas vacinas que sejam eficazes, ou seja, capazes de desenvolverem uma resposta imunológica altamente específica mas ao mesmo tempo seguras para os animais, sendo que atualmente estão em desenvolvimento vacinas de DNA de terceira geração e vacinas à base de péptidos.

A leishmaniose é uma doença negligenciada, sendo que a atenção que lhe é dada não é proporcional aos danos que provoca. A informação referente à sua distribuição e prevalência é incompleta e as estratégias implementadas para o seu controlo são insuficientes. Uma vigilância adequada dos dados existentes e a sua recolha sistemática através de métodos eficazes de reportar a CanL, VL e CL em cães, como em seres humanos, são essenciais para determinar a prevalência, a incidência e a distribuição nos países endémicos e para monitorizar a importação para países não endémicos de forma a identificar aglomerados

epidémicos e assim melhorar o controlo e a gestão da doença, salvaguardando a saúde pública.

Para além disso, os médicos veterinários devem ter conhecimento das diretrizes de diagnóstico, tratamento e controlo da leishmaniose canina, sendo essencial que transmitam aos tutores informações sobre as medidas de prevenção adequadas, nomeadamente as vantagens de um bom programa vacinal, associado a outros métodos de prevenção, como a utilização de inseticidas eficazes contra os flebótomos. O controlo da doença requer a cooperação entre todos os profissionais de saúde e de todos os países afetados. Uma abordagem comum “One Health”, com sinergismo entre profissionais de medicina humana, médicos veterinários, investigadores, autoridades de saúde pública e entidades políticas é crucial para restringir a disseminação desta doença.



Capítulo 5 – Bibliografía

- Abbehussen, M. M. C., Almeida, V. A., Solçà, M. S., Pereira, L. S., Costa, D. J., Gil- Santana, L.,... Brodskyn, C.I. (2017). Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Scientific Reports*, (June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15651-8>
- Alcolea, P. J., Alonso, A., & Larraga, V. (2018). The antibiotic resistance-free mammalian expression plasmid vector pPAL for development of third generation vaccines. *Plasmid*, YPLAS 2393. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.12.002>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Ayele, A., & Seyoum, Z. (2016). A Review on Canine Leishmaniasis: Etiology, Clinical Signs, Pathogenesis, Treatment and Control Methods. *Global Veterinaria*, 17(4), 343–352. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.17.04.104151>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x>
- Baxarias, M., Álvarez-fernández, A., Martínez-orellana, P., Montserrat-sangrà, S., Ordeix, L., Rojas, A., ... Solano-gallego, L. (2018). Does co-infection with vector-borne pathogens play a role in clinical canine leishmaniosis?. *Parasites & Vectors*, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2724-9>
- Belo, V. S., Struchiner, C. J., Werneck, G. L., Barbosa, D. S., de Oliveira, R. B., Neto, R. G. T., & da Silva, E. S. (2013). A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 195(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.010>
- Beugnet, F., Chomel, B. (2013). *Guide to Vector Borne Diseases of Pets*. Lyon: MERIAL. SAS.
- Beugnet, F., Halos, L., Guillot, J. (2018). *Textbook of Clinical Parasitology in dogs and cats*. Servet editorial - Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J. L., & Bourdoiseau, G. (2001). Atypical Forms of Canine Leishmaniosis. *Veterinary Journal*, 162(2), 108–120. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0556>
- Bongiorno, G., Paparcone, R., Manzillo, V., Oliva, G., Cuisinier, A., & Gradoni, L. (2013). Vaccination with LiESP / QA-21 (CaniLeish ®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs - A preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*, 197(3–4), 691–695. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.008>

- Borja-cabrera, G. P., Mendes, A. C., Paraguai de Souza, E., Okada, L. Y. H., Trivellato, F. A., Kawasabi, J. K., ... Palatnik-de-sousa, C. B. (2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, 22, 2234–2243. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.039>
- Bourdeau, P., Saridomichelakis, M. N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R.,... Miró, G. (2014). Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: A questionnaire-based multinational survey. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1-14. Retrieved from <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/110>
- Brianti, E., Napoli, E., Gaglio, G., Falsone, L., Giannetto, S., Basano, F. S.,... Otranto, D. (2016). Field Evaluation of two different treatment approaches and their ability to control fleas and prevent canine leishmaniosis in a highly endemic area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(9): e0004987. DOI:10.1371/journal.pntd.0004987
- Brito, R. C. F. De., Cardoso, J. M. D. O., Reis, L. E. S., Vieira, J. F., Mathias, F. A. S., Roatt, B. M.,... Reis, A. B. (2018). Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 9(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01043>
- Carson, C., Quinnell, R. J., Holden, J., Garcez, L. M., Deborggraeve, S., & Courtenay, O. (2010). Comparison of Leishmania OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine Leishmania infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3325–3330. <https://doi.org/10.1128/JCM.02331-09>
- Cortadellas, O., Fernández-del Palacio, M. J., Talavera, J., & Bayón, A. (2009). Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Veterinary Record*, 164(16), 487–490. <https://doi.org/10.1136/vr.164.16.487>
- Costa, C. H. N. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2), 232–242. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>
- Cotrina, F. J., Iniesta, V., Monroy, I., Baz, V., Hugnet, C., Marañón, F., ... Alonso, C. (2018). A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend against canine leishmaniosis. *Vaccine*, 36, 1972–1982. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.111>
- Coura-Vital, W., Leal, G. G. de A., Marques, L. A., Pinheiro, A. da C., Carneiro, M., Reis, A. B. (2018). Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS one*, 13 (12): e0208613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208613>
- Cristina, R. (1996). Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today*. 12 (10)
- Dalvi, A. P. R., Carvalho, T. D. G., & Werneck, G. L. (2018). Is There an Association Between Exposure to Cats and Occurrence of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs ?. *Vector-borne and zoonotic diseases*, XX(Xx). <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2162>

- Dantas-torres, F., Miró, G., Bowman, D. D., Gradoni, L., & Otranto, D. (2018). Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*, *xx*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>
- Dias, D. S., Martins, V. T., Ribeiro, P. A. F., Ramos, F. F., Lage, D. P., Tavares, G. S. V., ... Coelho, E. A. F. (2017). Antigenicity , immunogenicity and protective efficacy of a conserved *Leishmania* hypothetical protein against visceral leishmaniasis. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001731>
- Dias, D. S., Ribeiro, P. A. F., Martins, V. T., Lage, D. P., Ramos, F. F., Dias, A. L. T., ... Coelho, E. A. (2017). Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cellular Immunology*, (October), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.11.001>
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Duthie, M. S., Lison, A., & Courtenay, O. (2018). Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, *xx*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.012>
- Farca, A. M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A., & Ferroglio, E. (2012). Canine leishmaniosis: In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, *110*(6), 2509–2513. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2792-7>
- Faria, A. R., de Castro Veloso, L., Coura-Vital, W., Reis, A. B., Damasceno, L. M., Gazzinelli, R. T., & Andrade, H. M. (2015). Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(1), 13–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003429>
- Faria, A. R., Pires, S. F., Reis, A. B., Coura-Vital, W., Silveira, J. A.G., Sousa, G. M.,... Andrade, H. M. (2017). Veterinary Parasitology Canine visceral leishmaniasis follow-up: a new anti-IgG serological test more sensitive than ITS-1 conventional PCR. *Veterinary Parasitology*, *248*(August), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.020>
- Fernandes, A. P., Costa, M. M., Coelho, E. A. F., Michalick, M. S., Freitas, E.,... Gazzinelli, R. (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, *26*, 5888–5895. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.095>
- Fernandes, A. P., Coelho, E. A., Machado-Coelho, G. L. L., Junior, G. G., & Gazzinelli, R. T. (2012). Making an anti-amastigote vaccine for visceral leishmaniasis: rational , update and perspectives. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(4), 476–485. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.05.002>

- Fernandes, C. B., Junior, J. T. M., Jesus, C., Souza, B. M., Larangeira, D. F., Fraga, D. B., ... Barrouin-melo, S. M. (2014). Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. *Vaccine*, 32(11), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.046>
- Fraga, D. B. M., Pacheco, L. V., Borja, L. S., Tuy, P. G. da S. E., Bastos, L. A., Solcà, M. da S., ... Veras, P. S. T. (2016). The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004333>
- Gálvez, R., Descalzo, M. A., Guerrero, I., Miró, G., & Molina, R. (2011). Mapping the current distribution and predicted spread of the Leishmaniosis sand fly vector in the Madrid region (Spain) based on environmental variables and expected climate change. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 11 (7), 799–806, 1–8. DOI: 10.1089/vbz.2010.0109
- Gálvez, R., Montoya, A., Fontal, F., Murguía, L. M. De, & Miró, G. (2018). Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. *Research in Veterinary Science*, 121(April), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.008>
- Geisweid, K., Mueller, R., Sauter-Louis, C., & Hartmann, K. (2014). Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Veterinary Record*. DOI: 10.1136/vr.100637. Downloaded from <http://veterinaryrecord.bmj.com/> on December 9, 2014
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(2), 613–626. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2384>
- Giannuzzi, A. P., Ricciardi, M., De Simone, A., & Gernone, F. (2017). Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *Journal of Small Animal Practice*, 58(3), 125–138. <https://doi.org/10.1111/jsap.12650>
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Lucientes, J., Gascon, M., Zarate, J. J., Arbea, J. I., ... Rodriguez, C. (2003). Modified Direct Agglutination Test for Simplified Serologic Diagnosis of Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(5), 967–968. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.967-968.2003>
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Gascón, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., & Couto, C. G. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: A clinical trial. *Veterinary Journal*, 179(2), 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.09.014>
- Gomez, S. A., & Picado, A. (2017). Systemic insecticides used in dogs: potential candidates for phlebotomine vector control? *Barcelona Institute for Global Health*. DOI: 10.1111/tmi.12870
- Gomez, S. A., Curdi, J. L., Antonio, J., Hernandez, C., Peris, P. P., Gil, A. E., ... Picado, A. (2018). Phlebotomine mortality effect of systemic insecticides administered to dogs. *Parasites & Vectors*, 1–9, 11:230. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2820-x>

- Gradoni, L. (2015). Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>
- Gradoni, L., López-Velez, R., & Mokni, M. (2017). Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. *World Health Organization*. Regional office for Europe.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11–12), 1169–1180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>
- Heidarpour, M., Soltani, S., Mohri, M., & Khoshnegah, J. (2012). Canine Visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitol Res*, 111:1491–1496. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2985-8>
- Hosein, S., Blake, D. P., & Solano-Gallego, L. (2016). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology*, 144(1), 95–115. <https://doi.org/10.1017/S003118201600055X>
- Iborra, S., Parody, N., Abánades, D. R., Bonay, P., Prates, D., Novais, F. O.,... Soto, M. (2008). Vaccination with the Leishmania major ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. *Institut Pasteur*, 10, 1133–1141. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.06.002>
- Ikeda-garcia, F. A., Lopes, R. S., Marques, J., Morinishi, C. K., Zanette, F., Perri, H. V., & Marcondes, M. (2010). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate and allopurinol, *Vet. Res. Anim. Sci*, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 218-223
- Junior, C. G. C., Neto, R. G. T., Lopes, V. V, Belo, V. S., Alves, N. R., de Paula, T. B.,... Silva, E. S. (2017). Parasitism and inflammation in ear skin and in genital tissues of symptomatic and asymptomatic male dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5375-4>
- Karkamo, V., Kaistinen, A., Näreaho, A., Dillard, K., Vainio-siukola, K., Vidgrén, G.,... Anttila, M. (2014). The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0084-9>
- Kaszak. I., Planellas, M., & Dworecka-Kaszak, B. (2015). Canine leishmaniosis - an emerging disease. *Annals of Parasitology*, 61(2), 69–76. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136749>
- Kazimoto, T. A., Amora, S. S., Figueiredo, F. B., Magalhães, J. M., Freitas, Y. B. N., Reginaldo, M. L.,... Werneck, G. L. (2018). Impact of 4% Deltamethrin-Impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral Leishmaniasis. *Vector-borne and zoonotic diseases*, xx(xx). DOI: 10.1089/vbz.2017.2166

- Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Billinis, C., ... Papadopoulos, O. (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 98(4), 247–261. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00399-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00399-5)
- Koutinas, A. F., & Koutinas, C. K. (2014). Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2), 527–538. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>
- Laurenti, M. D., Rossi, C. N., Matta, V. L. R. da, Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Secundino, N. F. C., ... Marcondes, M. (2013). Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology*, 196(3–4), 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.03.017>
- Lehane, M.J. (2005). The biology of blood-sucking in insects, Second Edition. Cambridge University Press, New York, NY, 336 p.
- Le Rutte, Epke., Straten, R. V., & Overgaauw, P. A. M. (2018). Awareness and control of canine leishmaniosis: A survey among Spanish and French veterinarians. *Veterinary Parasitology*, 253 (2018) 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.013>
- Lima, W. G., Michalick, M. S. M., Melo, M. N. De, Tafuri, W. L., & Tafuri, W. L. (2004). Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. *Acta Tropica*, 92(1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.007>
- Lladró, S., Picado, A., Ballart, C., Portús, M., & Gállego, M. (2016). Management, prevention and treatment of canine leishmaniosis in north-eastern Spain: na online questionnaire-based survey in the province of Girona with special emphasis on new prevention methods (CaniLeish vaccine and domperidone). *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.010>
- Lombardo, G., Pennisi, M. G., Lupo, T., Migliazzo, A., Caprì, A., & Solano-Gallego, L. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>
- Lopes, E. G., Sevá, A. P., Ferreira, F., Nunes, C. M., Keid, L. B., & Hiramoto, R. M.,...Soares, R.M. (2018). Vaccine effectiveness and use of collar impregnated with insecticide for reducing incidence of *Leishmania* infection in dogs in an endemic region for visceral leishmaniasis , in Brazil. *Epidemiology and Infection*. <https://doi.org/10.1017/S0950268817003053>
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008>
- Maia, C., & Cardoso, L. (2015). Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Veterinary Parasitology*, 213(1–2), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>

- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., & Gravino, A. E. (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0896-0>
- Manzillo, V. F., Di Muccio, T., Cappiello, S., Scalone, A., Paparcone, R., Fiorentino, E., ... Oliva, G. (2013). Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002225>
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
- Martin, V., Vouldoukis, I., Moreno, J., McGahie, D., Gueguen, S., & Cuisinier, A. (2014). The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP / QA-21 vaccine (CaniLeish ®) remains effective against an experimental challenge one year later. *Veterinary Research*, 45, 1–15. <http://www.veterinaryresearch.org/content/45/1/69>
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., & Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmania infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5515–5519. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5515>
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003>
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C., & Bianciardi, P. (2009). Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, 20(5–6), 397–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x>
- Miró, G., & López-Vélez, R. (2018). Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary Parasitology*, 254(March), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>
- Mohammadiha, A., Mohebbali, M., Haghighi, A., Mahdian, R., Abadi, A. R., Zarei, Z., ... Akhoundi, B. (2013). Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Experimental Parasitology*, 133(1), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.017>

- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4)
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Schreiber, P., Martin, V., McGahie, D., Gueguen, S., & Cuisinier, A. (2014). Veterinary Immunology and Immunopathology Primary vaccination with the LiESP / QA-21 vaccine (CaniLeish ®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(3–4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.011>
- Moreira, M. L., Costa-Pereira, C., Alves, M. L., Marteleto, B. H., Ribeiro, V. M., Peruhype-Magalhães, V., ... Araújo, M. S. S. (2016). Vaccination against canine leishmaniosis increases the phagocytic activity , nitric oxide production and expression of cell activation / migration molecules in neutrophils and monocytes. *Veterinary Parasitology*, 220, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.009>
- Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Acedo-Sanchez, C., Pineda, J. A., Macias, J., & Sanjuan-Garcia, J. (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, Kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Exp. Parasitol.*, 100(1), 71–74. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4678>
- Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-67>
- Naucke, T. J., Amelung, S., & Lorentz, S. (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & Vectors*, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1551-0>
- Nogueira, F. S., Moreira, M. A. B., Borja-cabrera, G. P., Santos, F. N., & Menz, I., Parra, L. E., ... Luvizotto, M. C. R. (2005). Leishmune ® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis Absence of *Leishmania* parasites in blood , skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, 23, 4805–4810. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.011>
- Noli, C., & Auxilia, S. T. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*, 16(4), 213–232.
- Noli, C., & Saridomichelakis, M. N. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. L.-chagasi). *Veterinary Journal*, 202(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002>
- Oliva, G., Nieto, J., Manzillo, V. F., Cappiello, S., Fiorentino, E., Muccio, T. D., ... Gradoni, L. (2014). A Randomised , Double-Blind , Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003213>
- Ordeix, L., Dalmau, A., Osso, M., Llull, J., Montserrat-Sangrà, S., & Solano-Gallego, L. (2017). Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2051-6>

- Otranto, D., & Dantas-torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*, 29(7), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Mihalca, A. D., Traub, R. J., Lappin, M., & Baneth, G. (2017). Zoonotic Parasites of Sheltered and Stray Dogs in the Era of the Global Economic and Political Crisis. *Trends in Parasitology*, 33(10), 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.013>
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Silva-antunes, I., Morgado, A. A., Menz, I., Palatnik, M., & Lavor, C. (2009). Decrease of the incidence of human and canine visceral leishmaniasis after dog vaccination with Leishmune® in Brazilian endemic areas. *Vaccine*, 27, 3505–3512. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.045>
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 3(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00069>
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M.,... Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Vet Med Today: Reference Point*, 236 (11), 1184-1191, 1-8.
- Paltrinieri, S., Gradoni, L., Roura, X., Zatelli, A., & Zini, E. (2016). Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, 1–27. <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>
- Panaro, M. A., Brandonisio, O., Cianciulli, A., Cavallo, P., Lacasella, V., Paradies, P., ... Otranto, D. (2009). Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology*, 136(8), 823–831. <https://doi.org/10.1017/S0031182009006155>
- Parra, L. E., Borja-cabrera, G. P., Santos, F. N., Souza, L. O. P., Palatnik-de-sousa, C. B., & Menz, I. (2007). Safety trial using the Leishmune® vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*, 25, 2180–2186. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.057>
- Paulin, S., Frénais, R., Thomas, E., & Baldwin, P. M. (2018). Laboratory assessment of the anti-feeding effect for up to 12 months of a slow release deltamethrin collar (Scalibor®) against the sand fly *Phlebotomus perniciosus* in dogs. *Parasites & Vectors*, 1–7, 11:529. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3094-z>
- Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Veterinary Parasitology Feline leishmaniosis : Is the cat a small dog?. *Veterinary Parasitology*, 251(January), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>
- Pereira, M., Prata, A., Oliveira, R., Costa, L., Gonçalves, V., Roquete, M & Gomes, G. S (2019). Prognostic factors and management of canine leishmaniosis in economically disadvantaged regions. Southern European Veterinary Conference, Congresso Nacional Avepa, Sevilha, 7-9 November, 2019. <https://www.researchgate.net/publication/337363344>
- Perego, R., Proverbio, D., Bagnagatti De Giorgi, G., & Spada, E. (2014). Prevalence of dermatological presentations of canine leishmaniasis in a nonendemic area: A retrospective study of 100 dogs. *Veterinary Medicine International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/374613>

- Pierantozzi, M., Roura, X., Paltrinieri, S., Poggi, M., & Zatelli, A. (2013). Variation of Proteinuria in Dogs with Leishmaniasis Treated with Meglumine Antimoniate and Allopurinol: A Retrospective Study. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 49(4), 231–236. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-5840>
- Pietro, S. Di, Francesca Bosco, V. R., Crinò, C., Francaviglia, F., & Giudice, E. (2016). Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary World*, 9(6), 633–637. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.633-637>
- Pineda, C., Aguilera-Tejero, E., Morales, M. C., Belinchon-Lorenzo, S., Gomez-Nieto, L. C., Garcia, P., ... Lopez, I. (2017). Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *PLoS ONE*, 12(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185981>
- Proverbio, D. (2016). The Use of Two Clinical Staging Systems of Canine Leishmaniasis in A Clinical Setting: A Critical Evaluation. *Jvcpc*, (June 2016), 1–3. <https://doi.org/10.17303/jvcpc.2016.103>
- Rakhshanpour, A., Malmasi, A., Mohebali, M., Nabian, S., Mirhendi, H., Zarei, Z.,... Azarm, A. (2017). Transmission of *Leishmania infantum* by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Dogs. *Iran J Parasitol*, 12(4), 482–489.
- Reguera, R. M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., & Balaña-Fouce, R. (2016). Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 227, 98–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>
- Ribeiro, R. R., Silva, S. M. da, Fulgêncio, G. de O., Michalick, M. S. M., & Frézard, F. J. G. (2013). Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3), 373–378. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000300009>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., Da Silva, M. E., Dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & Da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018(C1). <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>
- Roura, X., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Maroli, M., Oliva, G., ... Zini, E. (2013). Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report. *Veterinary Journal*, 198(1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.001>
- Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., & Ferrer, L. (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1–2), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.010>
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., & Francino, O. (2008). Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*, 39(3). <https://doi.org/10.1051/vetres:2008013>

- Santarém, N., Silvestre, R., Cardoso, L., Schallig, H., Reed, S. G., & Cordeiro-da-Silva, A. (2010). Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1866–1874. <https://doi.org/10.1128/JCM.02402-09>
- Santos, M., Pires, G.A., Pereira, M., Marques, C., Gomes, J., Correia, J & Duarte, A (2019). Meglumine antimoniate and miltefosine combined with allopurinol sustain pro-inflammatory immune environments during canine leishmaniosis treatment. *Frontiers in Veterinary Science*. <http://doi: 10.3389/fvets.2019.00362>
- Saridomichelakis, M. N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20(5–6), 471–489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x>
- Schäfer, I., Volkmann, M., Beelitz, P., Merle, R., Müller, E., & Kohn, B. (2019). Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007 – 2015). *Parasites & Vectors*, (2019) 12:30. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3284-8>
- Selder, R., Weber, K., Bergmann, M., Geisweid, K., & Hartmann, K. (2018). Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, 232, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.006>
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>
- Sirekbasan, S., & Polat, E. (2018). Real-time PCR using high-resolution melting analysis technology for diagnosis of *Leishmania* and determination of types of clinical samples. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48:1358–1363. <https://doi.org/10.3906/sag-1807-187>
- Slimane, T. Ben, Chouihi, E., Hadj, S. Ben, Chelbi, I., Barhoumi, W., Cherni, S., ... Zhioua, E. (2014). Veterinary Parasitology An investigation on vertical transmission of *Leishmania infantum* in experimentally infected dogs and assessment of offspring ' s infectiousness potential by xenodiagnosis. *Veterinary Parasitology*, 206(3–4), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.020>
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 90(1–2), 37–45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00223-5)
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, 4(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>
- Solano-gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Petersen, C., Bourdeau, P., Oliva, G., ... Baneth, G. (2017). Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends in Parasitology*, xx, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Garcia, M., Guzman, F., Patarroyo, M. E., & Alonso, C. (1995). Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunology Letters*, 48, 209–214.
- Soto, M., Corvo, L., Garde, E., Ramírez, L., Inieta, V., Bonay, P., ... Iborra, S. (2015). Coadministration of the Three Antigenic *Leishmania infantum* Poly (A) Binding Proteins as a DNA Vaccine Induces Protection against *Leishmania major* Infection in BALB / c Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 0-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003751>
- Starita, C., Gavazza, A., & Lubas, G. (2016). Hematological, Biochemical, and Serological Findings in Health Canine Blood Donors after the Administration of CaniLeish. *Veterinary Medicine International*, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4601893>
- Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 9 (5), 951-958, 1071-412X/02/\$04.00_0. DOI: 10.1128/CDLI.9.5.951–958.2002
- Svobodova, V., Svoboda, M., Friedlaenderova, L., Drahotsky, P., Bohacova, E., & Baneth, G. (2017). Canine leishmaniosis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 237, 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.025>
- Toepp, A., Larson, M., Wilson, G., Bennett, C., Leal-Lima, A., Anderson, B., ... Petersen, C. (2018). Randomized, controlled, double-blinded field trial to assess *Leishmania* vaccine effectiveness as immunotherapy for canine leishmaniosis. *Vaccine*, xxx (2018) xxx–xxx. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.087>
- Torres, M., Pastor, J., Roura, X., Tabar, M. D., Espada, Y., Font, A., ... Planellas, M. (2016). Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 57(6), 299–304. <https://doi.org/10.1111/jsap.12484>
- Trájer, A. J., Bede-Fazekas, Á., Hufnagel, L., Horváth, L., Bobvos, J., & Páldy, A. (2013). The effect of climate change on the potential distribution of the european phlebotomus species. *Applied Ecology and Environmental Research*, 11(2), 189–208. https://doi.org/10.15666/aeer/1102_189208
- Travi, B. L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., & Miró, G. (2018). Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>

- Travi, B. L., & Miró, G. (2018). Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis : gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 113(11): e180301, 2018, 1–4. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180301>
- Velez, R., Ballart, C., Domenech, E., Abras, A., Gómez, S. A., Tebar, S., ... Gállego, M. (2018). Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: the example of North-Eastern and Pyrenean areas. *Preventive Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.015>
- Viana, K. F., Lacerda, G., Teixeira, N. S., Cangussu, A. S., Aguiar, R. W., & Giunchetti, R. C. (2018). Therapeutic vaccine of killed *Leishmania amazonensis* plus saponin reduced parasite burden in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.010>
- Vulpiani, M. P., Iannetti, L., Di Mattia, T., & Dalla Villa, P. (2009). *Leishmania infantum* in a Central Italy dog shelter: Retrospective study of serologic reactivity during a 4-year period in a confined dog population subjected to preventive and therapeutic treatment. *Veterinary Parasitology*, 160(3–4), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.014>
- Vulpiani, M. P., Iannetti, L., Paganico, D., Iannino, F., & Ferri, N. (2011). Methods of control of the *Leishmania infantum* dog reservoir: State of the art. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/215964>
- Willen, L., Mertens, P., & Volf, P. (2018). Evaluation of the rSP03B sero-strip , a newly proposed rapid test for canine exposure to *Phlebotomus perniciosus* , vector of *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical diseases* 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006607>
- Yasur-Landau, D., Jaffe, C. L., David, L., & Baneth, G. (2016). Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004341>